

Lokale und systemische Veränderungen
der Aktivität saurer und neutraler Proteinasen
der Ratte in der Frühphase
der Verbrennungskrankheit.
Proteinaseinhibition durch Pepstatin
bei experimentell erzeugter Peritonitis
des Meerschweinchens

Gerhard J. Seifert

Disbui. München

1987





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554619_0034

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. G. Heberer

Lokale und systemische Veränderungen der Aktivität saurer und neutraler
Proteinasen der Ratte in der Frühphase der Verbrennungskrankheit.
Proteinaseninhibition durch Pepstatin bei experimentell erzeugter
Peritonitis des Meerschweinchens.

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Gerhard J. Seifert
aus
Wuppertal

1987

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. R. G. Baumeister

Mitberichterstatter: Prof. Dr. G. Heberer

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 22. 10. 1987

Meiner Frau und meinen Töchtern

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Geschichte der Proteinaseforschung	1
1.2.	Nomenklatur und Klassifikation der Proteinase	1
1.2.1.	Terminologie der Proteinase	2
1.2.2.	Klassifikation der Kathesine	3
1.2.2.1.	Kathesin A	3
1.2.2.2.	Kathesin B	5
1.2.2.3.	Kathesin C	6
1.2.2.4.	Kathesin D	6
1.2.2.5.	Kathesin E	9
1.2.3.	Neutrale Proteinase	9
1.3.	Die Verbrennungskrankheit unter dem Aspekt der Proteinasefreisetzung	10
1.3.1.	Burn Syndrom	11
1.3.2.	Permeabilitätsstörungen der Kapillaren	12
1.4.	Mediatoren	13
1.4.1.	Mediatoren Typ I	13
1.4.2.	Mediatoren Typ II - Proteinase und spezifische Faktoren	14
1.5.1.	Störungen der Mikrozirkulation	14
1.5.2.	Circulus vitiosus des Schocks	15
1.5.3.	Azidose	15
1.5.4.	Strömungsverlangsamung	15
1.5.5.	Proteolyse	16
2.	Eigene Untersuchungen	17
2.1.	Material und Methode	18
2.2.	Ergebnisse	20
2.2.1.	Saure Proteinase	20
2.2.2.	Neutrale Proteinase	26
2.3.	Diskussion	31
3.	Einleitung	33
3.1.	Experimentell erzeugte Peritonitis als Modell eines septischen Schocks	33
3.2.1.	Veränderungen der Hämodynamik	34

3.2.2.	Immunologische Veränderungen während des septischen Schocks	37
3.2.3.	Pathobiochemische Veränderungen während des septischen Schocks	37
3.3.	Pepstatin	40
3.3.1.	Molekülaufbau und chemische Struktur	40
3.3.2.	Biochemische Eigenschaften	41
4.	Eigene Untersuchungen	42
4.1.	Material und Methode	42
4.2.	Ergebnisse	43
4.2.1.	Saure Proteinasen	44
4.2.2.	Neutrale Proteinasen	53
4.2.3.	Lebenszeiten	63
4.3.	Diskussion	63
5.	Zusammenfassung	68
6.	Literaturverzeichnis	73

1. Einleitung

1.1. Geschichte der Proteinaseforschung

Die Geschichte der Erforschung der proteolytischen Enzyme begann kurz vor der Jahrhundertwende. SALKOWSKI beschrieb 1890 chemische Veränderungen in Leber, Muskulatur und Nebennieren, nachdem er diese Organe bei 37 Grad C inkubiert hatte. Er vermutete bereits damals Autodigestion, die er auch in weiteren Arbeiten bestätigen konnte.

Der Begriff der Autolyse wurde durch JACOBY eingeführt.

HELDIN und ROWLAND vom Lister Institut in London beschrieben die Aktivitäten von sauren Proteinase der Milz im Jahr 1901 (nach 11). HEDIN extrahierte aus Milzgewebe im sauren pH-Milieu eine Proteinase, die heute als Kathepsin D bezeichnet wird. Ihm gelang auch die Abgrenzung von Pepsin. Der Begriff "Kathepsin" wurde 1929 von WILLSTÄTTER und RAMANN eingeführt (100). Kathepsin wurde dabei als eigenständige Proteinase von Pepsin abgegrenzt.

Die Isolierung erfolgte aus der Magenmukosa vom Schwein.

Unter schwach sauren Bedingungen entfaltet Kathepsin eine stärkere proteolytische Aktivität als Pepsin. Schon damals wurde vermutet, daß Kathepsin ubiquitär vorkommt. Jedoch erscheint es nach heutigem Wissensstand zweifelhaft, ob das aus der Magenmukosa isolierte Kathepsin mit dem Kathepsin D identisch ist.

Unbestritten ist das Verdienst von WILLSTÄTTER und RAMANN, den Begriff "Kathepsin" in die biochemische Terminologie eingeführt zu haben.

TALLAN und Mitarbeiter ordneten 1952 die Kathepsine, indem sie eine Unterteilung in Kathepsin A, B und C schufen. In neuerer Zeit ist die Gruppe der Kathepsine nochmals neu definiert worden.

1.2. Nomenklatur und Klassifikation der Proteasen

In der Literatur werden die Begriffe Proteasen, Proteinase und proteolytische Enzyme synonym nebeneinander gebraucht.

Etwa seit Mitte der siebziger Jahre hat man sich einheitlich auf die Bezeichnung "Proteasen" als Überbegriff geeinigt.

1.2.1 Terminologie der Proteasen

Der Oberbegriff "Proteasen" schließt sowohl Exopeptidasen wie Endopeptidasen ein.

Exopeptidasen sind dadurch gekennzeichnet, daß sie nur vom Anfang oder Ende einer Peptidkette her Aminosäuren abspalten. Eine weitere Differenzierung erfolgt hier zwischen Carboxypeptidasen, die die Peptidkette vom Carboxyterminus her spalten und Aminopeptidasen, die vom Aminoterminal her spalten.

Endopeptidasen spalten Proteine dagegen an definierten Stellen innerhalb der Peptidkette. Proteasen hydrolysieren auch synthetische Substrate und bestimmte Aminosäureverbindungen (18). Von Proteinasen im engeren Sinne spricht man, wenn die Enzyme Proteine und Polypeptide abzubauen vermögen.

Name	Substrat bzw. Spezifität	Vorkommen bzw. Bildungsstätte
Carboxypeptidase A	$\text{Peptidyl} \begin{array}{c} \downarrow \text{Phe} \\ \downarrow \text{Tyr} \\ \downarrow \text{Try} \\ \downarrow \text{Leu} \\ \downarrow \text{R} \end{array}$	Pankreas
Carboxypeptidase B	$\text{Peptidyl} \begin{array}{c} \downarrow \text{Lys} \\ \downarrow \text{Arg} \end{array}$	Pankreas
Leucin-Aminopeptidase	$\text{Leu} \begin{array}{c} \downarrow \text{Peptid} \\ \downarrow \text{Peptid} \end{array}$	Dünndarmschleimhaut, viele Organe
Amino-Tripeptidase	$\text{R} \begin{array}{c} \downarrow \text{Dipeptid} \end{array}$	Dünndarmschleimhaut, viele Organe
Glycyl-glycin-Dipeptidase	$\text{Gly} \begin{array}{c} \downarrow \text{Gly} \end{array}$	Muskel, Uterus u.a. Organe
Glycyl-leucin-Dipeptidase	$\text{Gly} \begin{array}{c} \downarrow \text{Leu} \end{array}$	Dünndarmschleimhaut, Muskel, Uterus u.a.
Prolidase (Imido-Dipeptidase)	$\text{Gly} \begin{array}{c} \downarrow \text{Pro} \end{array}$	Dünndarmschleimhaut, Muskel u.a.
Prolinase (Imino-Dipeptidase)	$\text{Pro} \begin{array}{c} \downarrow \text{Gly} \end{array}$	Dünndarmschleimhaut
Aminoacyl-histidin-Dipeptidase	$\text{Gly} \begin{array}{c} \downarrow \text{His} \\ \downarrow \text{Ala} \end{array} \text{His}$	Niere
Alanin-glycin-Dipeptidase	$\text{Ala} \begin{array}{c} \downarrow \text{Gly} \end{array}$	Niere
Cysteinyl-glycin-Dipeptidase	$\text{Cys} \begin{array}{c} \downarrow \text{Gly} \end{array}$	Dünndarmschleimhaut, Leber, Muskel, Niere u.a.

Abb. 1: Beispiele für Exopeptidasen
aus: Ruddecke, E.: Grundriß der Biochemie (18)

1.2.2. Klassifikation der Kathepsine

1.2.2.1. Kathepsin A

Ursprünglich wurde Kathepsin A als dasjenige Enzym (isoliert aus Rindermilz) definiert, das die Verbindung Carbobenzoxycarboxyl-L-Glutamin-L-Tyrosin spaltet. Aus Hühnermilz wurde jedoch später ein Kathepsin A isoliert, das als Carboxypeptidase wirksam ist, die vom C-terminalen Ende des Glucagons Aminosäuren



abspaltet. Kathepsin A besitzt nur eine geringe Wirksamkeit gegenüber Proteinen, es wirkt jedoch synergistisch zusammen mit Endopeptidasen, wie z.B. Kathepsin D.

Durch Cystein und Jodoazetamid wird es nicht gehemmt (11, 30).

Name	Substrat bzw. Spezifität	Vorkommen bzw. Bildungsorte
Pepsin	$\text{-Glu}\downarrow\text{-Tyr-}, \text{-Glu}\downarrow\text{-Phe-}$ $\text{-Cys}\downarrow\text{-Tyr-}, \text{-Tyr}\downarrow\text{-Cys-}$	Hauptzellen der Magenschleimhaut
Trypsin	$\text{-Arg}\downarrow\text{-R-}, \text{-Lys}\downarrow\text{-R-}, \text{Z-Arg}\downarrow\text{-NH}_2^*$	Pankreas
Chymotrypsin	$\text{-Tyr}\downarrow\text{-R-}, \text{-Phe}\downarrow\text{-R-}$ $\text{-Try}\downarrow\text{-R-}, \text{-Met}\downarrow\text{-R-}$	Pankreas
Elastase (Pankreatopeptidase E)	$\text{-R-neutrale Aminosäure}\downarrow\text{-R-}$	Pankreas
Enteropeptidase (Enterokinase)	Trypsinogen	Dünndarmschleimhaut
Kathepsin A	Proteine, $\text{Z-Glu}\downarrow\text{-Tyr}^*$	Milz, Leber, Niere u.a.
Kathepsin B	Benzoyl-Arg $\downarrow$ Amid*	Milz, Leber, Niere u.a.
Kathepsin C	Gly-Tyr $\downarrow$ Amid*	Milz, Leber, Niere u.a.
Kathepsin D	Proteine	Milz, Leber, Niere u.a.
Renin	Hypertensinogen	Niere
Thrombin	Fibrinogen	Serum
Plasmin	Fibrin	Serum

* synthetische Substrate

Abb. 2: Beispiele für Endopeptidasen
aus: Ruddecke, E.: Grundriß der Biochemie (18)

1.2.2.2. Kathepsin B

Kathepsin B (aus der Rinderleber isoliert) wurde zunächst als dasjenige Enzym definiert, das Benzoylargininamid (BAA) spaltet. Es hat sich jedoch gezeigt, daß mindestens zwei Enzyme in den Präparaten vorliegen müssen. Das besser erforschte Kathepsin B wurde fortan als Kathepsin B₁ bezeichnet. Es besitzt ein Molekulargewicht von ca. 24000 und spaltet synthetische Substrate wie Benzoylarginin-p-nitroanilid (BAPA) und das entsprechende Benzoylarginin-2-naphtylamid (BANA) ebenso gut wie das oben erwähnte BAA.

Das pH-Optimum dieser Reaktion liegt im Phosphatpuffer bei pH 6,2 (76).

Von KOMINAMI und Mitarbeitern wurde 1980 postuliert, daß Kathepsin B₁ in vivo eine Rolle beim Abbau der Fructosebiphosphataldolase im Rattenlebercytosol spielt. Ebenso wird eine Beteiligung bei der Endorphinproduktion diskutiert (52).

Durch Arbeiten von TAKIO und TOWATARI konnte die Struktur von Kathepsin B₁ geklärt werden.

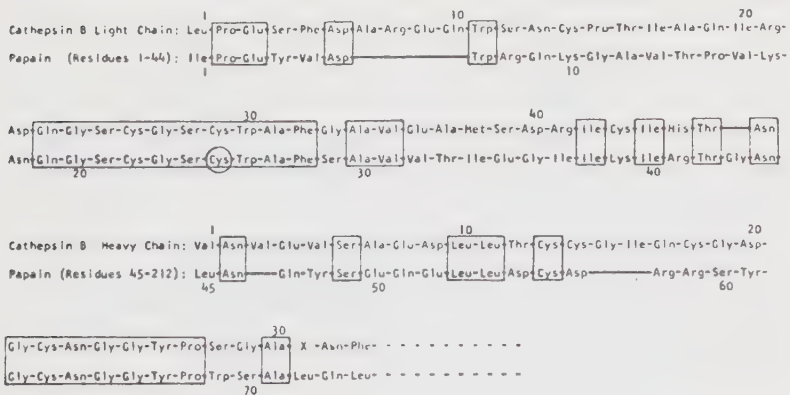


Abb. 3: Vergleich der Aminosäuresequenzen von Kathepsin B und Papain.
aus: Takio, K. et al.: Primary structure study of rat liver cathepsin B (89).

Es setzt sich aus zwei Ketten mit einem Molekulargewicht von ca. 25000 und ca. 5000 zusammen, die durch zwei Disulfidbrücken verbunden sind. Die Sequenzanalyse ergab eine große Ähnlichkeit mit Papain, insbesondere sind große Bereiche der Aminosäuresequenz um das enzymatisch aktive Zentrum identisch mit Papain, was wohl als Ausdruck einer phylogenetischen Verwandtschaft zu interpretieren ist.

1.2.2.3. Kathepsin C

Kathepsin C ist eine Exopeptidase mit breiter Substratspezifität. Es hydrolisiert Dipeptidnaphthylamid und spaltet vom N-terminalen Ende eines Polypeptids jeweils Dipeptide ab.

Dieser Eigenschaft verdankt es auch die Bezeichnung "Dipeptidyltransferase" und "Dipeptidylaminopeptidase I" (63).

Zur maximalen Aktivität benötigt es Thiol-Reagentien und Chlorid-Ionen im Ansatz.

1.2.2.4. Kathepsin D

Kathepsin D ist zusammen mit Kathepsin B₁ das interessanteste und am besten untersuchte Kathepsin. Es ist eine Endopeptidase mit einer Substratspezifität ähnlich der des Pepsins, was Polypeptide betrifft. Bei niedermolekularen Substraten zeigen sich jedoch größere Unterschiede zu Pepsin. Die Reaktionen laufen langsamer ab und das Substratspektrum ist enger. Da für Kathepsine nur wenige niedermolekulare synthetische Substrate bekannt sind, muß ihre Aktivität über die Bildung von Proteinabbauprodukten gemessen werden. Hämoglobin erwies sich dafür als ein geeignetes Substrat. Die proteolytische Aktivität gegenüber Hämoglobin deckt sich weitgehend mit dem Absorptionspeak bei 280 nm in der Chromatographie (50).

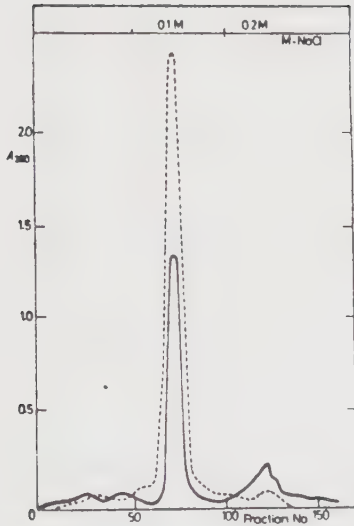


Abb. 4: Chromatographie von Cathepsin D
 -----Absorption bei 280 nm
 ----- Proteolytische Aktivität
 gegen Hämoglobin

aus: Keilová, H.: Bovine Cathepsins D and B (50)

In Arbeiten von KEILOVÁ und Mitarbeitern konnte 1969 noch nicht die Aminosäuresequenz, wohl aber die Aminosäurezusammensetzung aufgeklärt werden (50). Übereinstimmend fanden mehrere Untersucher ein pH-Optimum zwischen 3 und 4.

Amino acid	Residues/mole (mol. wt 58,000)	Amino acid	Residues/mole (mol. wt 58,000)
Lys	28	Ala	50
His	6	Cys	10
Arg	18	Val	49
Asp	45	Met	10
Thr	33	Ile	32
Ser	40	Leu	47
Glu	48	Tyr	23
Pro	30	Phe	21
Gly	51		

Tab. 1: Aminosäurezusammensetzung von Kathepsin D aus: Keilová, H.: Bovine Cathepsins D and B (50)

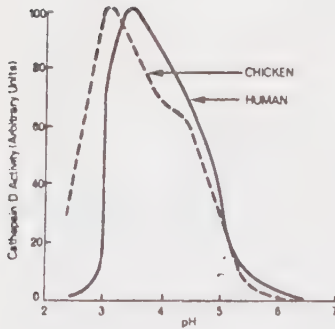


Abb. 5: pH-Abhängigkeit von Hühner- und Humankathepsin D mit Hämoglobin als Substrat.
aus: Barrett, A.J.: Cathepsin D and its isoenzymes (10)

Das Molekulargewicht von Kathepsin D wurde von KEILOVÁ mit 58000 angegeben (50). Es differiert erheblich mit dem aus den Untersuchungen von ATSUSHI, der das Molekulargewicht für sein aus Kaninchenmuskel isoliertes Kathepsin D mit 30000 angibt (7).

Wie bereits erwähnt, ist das Substratspektrum von Kathepsin D dem von Pepsin sehr ähnlich. Beim Vergleich der Spaltung der B-Kette von oxidiertem Insulin zeigt sich, daß beide Enzyme an ähnlichen Stellen angreifen, nämlich am Carboxylende von aromatischen oder aliphatischen Aminosäuren mit längeren Seitenketten, wie z.B. Leucin. Größere Unterschiede bestehen in der Spaltung von Oligopeptiden. Kathepsin D spaltet bevorzugt Bindungen von Phenylalanin. Dementsprechend wird als günstigstes synthetisches Substrat das Hexapeptid Gly-Phe-Leu-Gly-Phe-Leu gewählt. Die Spaltung erfolgt dabei in das Dipeptid Gly-Phe und die Vierersequenz Leu-Gly-Phe-Leu (50).

1.2.2.5. Kathepsin E

Bei ihren Untersuchungen über das von ihnen so genannte Kathepsin D stießen LAPRESLE und WEBB auf eine andere saure Proteinase, die in Spuren aus Kaninchenmilz extrahiert werden konnte. Weitere Nachforschungen ergaben, daß dieses Enzym hauptsächlich in polymorphkernigen Zellen (PMN) vorkommt. Für die Isolierung dieses Enzyms wurde im weiteren Verlauf Kaninchenknochenmark, das besonders reich an polymorphkernigen Zellen ist, benutzt. Es konnte nachgewiesen werden, daß dieses Enzym die Substrate von Kathepsin A, B und C nicht angreift und wurde daher von LAPRESLE und WEBB Kathepsin E genannt (56, 57).

Dieses Kathepsin E ist eine Endopeptidase. Ihr Vorkommen beschränkt sich auf wenige Organe, verglichen mit z.B. Kathepsin D. Es besitzt aber eine ähnliche Substratspezifität. Es hat ein hohes Molekulargewicht von ungefähr 100000. Das pH-Optimum ist niedriger als das von Kathepsin D mit Humanalbumin als Substrat.

1.2.3. Neutrale Proteinasen

Eine Gruppe neutraler Proteinasen ist am Abbau von Kollagen beteiligt.

Ihr Vorkommen konnte in vielen Organen und Geweben gesichert werden, so z.B. in Synovialgewebe, polymorphkernigen Granulozyten, Knochen, Haut, in der Cornea und beim Cholesteatom (24, 25, 32, 60).

Zu den wichtigsten pathophysiologischen Mechanismen vieler entzündlicher Prozesse zählt die Zerstörung von Gewebestrukturen und Zellmembranen und die dadurch bedingte Freisetzung zellständiger, meist lysosomaler Enzyme. Eine zentrale Stellung nehmen hier die polymorphkernigen (PMN) Granulozyten ein. Von besonderer Bedeutung ist dabei auch das Wirkungsoptimum solcher Proteinasen im physiologischen pH-Bereich.

Die drei bekanntesten neutralen Proteinasen aus Lysosomen sind Elastase, Kollagenase und Kathepsin G.

Neben verschiedenen Strukturproteinen inaktivieren Elastase und Kathepsin G in vitro eine Vielzahl von Plasmaproteinen. Biologische Substrate für Elastase sind Proteoglykane, Elastin, Immunglobuline, Gerinnungs-, Fibrinolyse- und Komplementfaktoren sowie Transportproteine. Für Kathepsin G gilt ein ähnliches Substratspektrum (45).

1.3. Die Verbrennungskrankheit unter dem Aspekt der Proteinase-freisetzung.

Seit den vierziger Jahren und den Arbeiten von COPE und MOORE 1944 (21) und BULL 1952 (19) wurde von einer Verbrennungskrankheit gesprochen.

Der Ablauf dieser Verbrennungskrankheit ist ein sehr komplexes Geschehen.

MOORE wählte bei seiner Einteilung der Verbrennungskrankheit in verschiedene Stadien deskriptive Gesichtspunkte und unterschied vier Phasen:

- Die erste Phase wird bestimmt vom Verbrennungsödem (1. - 4. Tag)
- die zweite Phase von der großflächigen Wunde (1. - 3. Woche)
- die dritte Phase vom Übergang der katabolen in die anabole Stoffwechsellaage (3. bis 4. Woche)
- und die vierte Phase von der Normalisierung und Rehabilitation.

Heute unterscheidet man zwischen

- lokalen Folgen
- systemischen Folgen
- und der Wirkung auf Organsysteme.

Das lokale Geschehen manifestiert sich an der Haut. Dabei sind die morphologischen und biochemischen Veränderungen von der Zeitdauer und der Temperatur der Hitzeeinwirkung abhängig.

Aber schon in den ersten Stunden nach dem thermischen Trauma kommt es zu zahlreichen Regulationsstörungen mit Verschiebungen im Wasser- und Elektrolythaushalt durch Störung der physiologischen Isoionie, Isoosmie und Isotonie. Durch freiwerdende Hydrolasen werden Abbauvorgänge einganggesetzt. Im Mittelpunkt stehen dabei die Störungen der Kapillarpermeabilität und der Mikrozirkulation (6). Diese Veränderungen sind allgemein beim Schockgeschehen zu beobachten und nicht nur auf den Verbrennungsschock begrenzt (66).

Von Interesse ist dabei auch die Frage, inwieweit saure und neutrale Proteinasen am Gesamtgeschehen beteiligt sind. In dieser Arbeit wurden daher mit einer von WEBER (97) modifizierten Methode nach ANSON von 1938 (1) die Aktivitäten saurer und neutraler Proteinasen in der Frühphase der Verbrennungskrankheit bestimmt.

1.3.1. Burn Syndrom

Ein thermisches Trauma und die dadurch ausgelöste Kettenreaktion pathologischer Abläufe im Organismus wird seit ARTURSON (1961) als "Burn Syndrom" bezeichnet (4).

Dieses Syndrom wird vor allem verursacht durch starke Flüssigkeitsverschiebungen qualitativer und quantitativer Art. Die auftretenden Symptome lassen sich drei zeitlichen Phasen zuordnen:

- erste Phase:

In der ersten Phase, die sich auf ca. 48 Stunden erstreckt, kommt es durch Veränderungen der Kapillarpermeabilität zu starken Flüssigkeitsverschiebungen und somit zu einer kardiozirkulatorischen Belastung und eventuell Insuffizienz, wobei das gesamte Organsystem betroffen ist. Zahlreiche Organe zeigen ödematöse Aufquellungen, durchsetzt mit Hämorrhagien. Im Vordergrund stehen dabei die Lunge mit Lungenödem; die Nieren mit Oligo- und Anurie, - bedingt durch Nierenrindennekrosen -, Leberveränderungen; Ulzerationen im Gastrointestinaltrakt und nicht zuletzt das Hirnödem.

- zweite Phase:
Am dritten bis achten Tag stellen sich die durch die Störungen des Wasser- und Elektrolythaushaltes bedingten degenerativen Organveränderungen ein. Sehr häufig kommt es jetzt zu Komplikationen durch Infektion der Brandwunde (68).
- dritte Phase:
In der dritten Phase, ab der zweiten Woche nach dem Trauma, kommt es zu Organatrophien mit beginnender fibrotischer Reparation.

1.3.2. Permeabilitätsstörungen der Kapillaren

Der wichtigste Aspekt der ablaufenden Entzündungsreaktion nach einer Verbrennung ist die zunächst lokal begrenzte, abnorme Kapillarpermeabilität, die zu einem Verlust proteinreicher Flüssigkeit in die Gewebsräume führt. Mit Hilfe radioaktiver Kolloide läßt sich tierexperimentell nachweisen, daß die Kapillaren im verbrannten Areal fast so durchlässig für Kolloide werden wie es intakte Kapillaren für Ionen sind. Im Gegensatz zu früheren Auffassungen ist man heute überzeugt, daß die veränderte Kapillarpermeabilität nicht nur auf das verbrannte Areal beschränkt bleibt, sondern auch fernab vom Ort des Geschehens auftritt und überall zu Ödemen führt. Die Flüssigkeit kann sich an der verbrannten Oberfläche oder auch subkutan sammeln, wenn die Hautoberfläche koaguliert ist.

Der oft enorme Flüssigkeitsverlust von mehreren Litern hält im allgemeinen etwa 48 Stunden an, wobei die Hälfte davon bereits in den ersten sechs bis acht Stunden aus dem Kreislauf verloren geht. Nach dieser 48-Stunden-Periode normalisiert sich der Zustand des Kapillarendothels, wenn nicht irreversible Schäden wie am Ort der Verbrennung vorliegen, und es kommt zu einer Rückresorption von Flüssigkeit aus dem ödematösen Gewebe. Durch Blutvolumenbestimmungen konnte festgestellt werden, daß Volumenverluste schon unmittelbar nach der Verbrennung einsetzen. Bereits ein bis zwei Stunden danach kommt es in Abhängigkeit von der betroffenen Fläche zu einer 15- bis 30%igen Abnahme des zirkulierenden Blutvolumens. Daraus leitet sich der allgemein akzeptierte therapeutische Ansatz ab,

in den ersten Stunden nach einer Verbrennung eine aggressive Volumentherapie zu betreiben.

Das sehr schnell einsetzende Ödem beruht auf einem Verlust von intravasaler Flüssigkeit in das extravasale Gewebe. Verantwortlich dafür sind:

- erhöhter Filtrationsdruck
- erhöhter osmotischer Gradient vom Plasma ins Gewebe
- Permeabilitätsstörungen der Gefäße, insbesondere der Kapillaren, verursacht durch Schädigung der Basalmembran.

Dabei ist der Verlust an osmotisch wirksamem Albumin höher als der der höhermolekularen Globuline. Der kolloidosmotische Druck beim Gesunden beträgt im Mittel 24 - 26 mm Hg (34). Bei einem kolloidosmotischen Druck von weniger als 19 mm Hg besteht nach den Untersuchungen von WEIL die Gefahr des Pulmonalödems (99). Zudem treten korpuskuläre Elemente aus: Granulozyten, Lymphozyten, Monozyten und Erythrozyten. Der Sinn dieser Extravasation liegt in der Einleitung reparativer Vorgänge: Abtransport und Hemmung toxischer Stoffwechselprodukte und freier Enzyme, Phagozytose und Neubildung von Geweben durch Fibroblasten. In diesem pathophysiologischen Geschehen spielen Vorgänge an der Basalmembran eine große Rolle. Stoffe, die die Basalmembran schädigen, sind

- die biogenen Amine Histamin und Serotonin sowie das Prostaglandin PGE_2
- die Polypeptide Bradykinin und Kallidin
- die Proteinasen Kallikrein, Plasmin, Trypsin, Phospholipase, Kollagenasen und Kathepsine
- verschiedene Mediatoren wie Lysolektithine und Pyrogene.

1.4. Mediatoren

HABERMANN unterscheidet zwei Typen von gefäßaktiven Substanzen:

1.4.1. Mediatoren Typ I

Der Mediatortyp I greift an der Tunica interna des Gefäßendothels an und reguliert die Filterfunktion für Plasmaproteine. Dazu gehören Kinine, Histamin und Prostaglandine (Übersicht bei HAERKAMP (36)). Besonders

den Prostaglandinen ist in den letzten Jahren große Aufmerksamkeit zuteil geworden. Die Rolle der Mediatoren bei der mikrovaskulären Durchlässigkeit ist umstritten. Es ist bekannt, daß die Biosynthese der Prostaglandine, hauptsächlich von PGE_2 , mit steigender Intensität der Entzündungsreaktion nach der Ausschüttung von Histamin zunimmt. Die Schädigung der Zellmembran aktiviert die Enzyme, die die Hydrolyse von Prostaglandinvorstufen (Arachidonsäure) katalysieren und somit zur raschen Bildung von PGE_2 führen.

1.4.2. Mediatoren Typ II - Proteinasen und spezifische Faktoren.

Die Permeabilitätserhöhung durch Typ II - Mediatoren beruht auf einer Strukturtoxizität z.B. von Tensiden, Proteinasen wie Trypsin, Phospholipase A - mit Beziehungen zur Prostaglandinsynthese - und lysosomalen Enzymen wie Kollagenase, Elastase und Kathepsinen (35).

In dieser Arbeit galt die Aufmerksamkeit den Proteinasen in zwei verschiedenen pH-Bereichen:

- im sauren Bereich bei pH 3,2 und
- im neutralen Bereich bei pH 7,6.

1.5.1. Störung der Mikrozirkulation

Da es bei Verbrennungen zu schweren Erythrozytendeformierungen kommt, wobei deren Elastizität verloren geht und die Passage durch feinste Kapillaren blockiert wird, ist die Störung der Mikrozirkulation - das sogenannte "sludge"-Phänomen - ein wichtiges Geschehen bei ausgedehnten thermischen Verletzungen. SCHNELLS konnte am Beispiel der Lunge zeigen, daß die endothelialen Schranken so durchlässig sind, daß mühelos alle korpuskulären Blutbestandteile durch sie hindurch wandern können. Die Erythrozyten treten auf diese Weise frei in die Alveolarhöhle über. Man sieht auch in Frühstadien des Schockgeschehens bereits sogenannte Plasmastraßen, die aus abgepreßtem Plasma, das die Basalmembran bereits passiert hat, bestehen. Erythrozyten sind in größerer Zahl in diese Plasmastraßen eingebettet (82).

1.5.2. Circulus vitiosus des Schocks

Der folgenschwere, eigenen Gesetzen gehorchende Ablauf des Schockgeschehens bei Verbrennungen ist als Circulus vitiosus ein Kardinalsymptom aller Schockformen (mit Ausnahme des neurogenen Schocks), wobei Schock definiert ist als Zustand beeinträchtigter Zirkulation mit ungenügender Gewebespersion und einem Mißverhältnis zwischen dem Sauerstoffbedarf der Gewebe und der zirkulatorischen Sauerstoffzufuhr. Neben den allgemeinen pathophysiologischen Abläufen während des Schocks kommt es bei Verbrennungen oft bereits in der Frühphase zu erheblichen Störungen der Blutgerinnung im Sinne einer Hyperkoagulabilität (53).

1.5.3. Azidose

Als metabolische Folge einer unzureichenden Sauerstoffversorgung muß sich der Gewebe- und Zellstoffwechsel von aerober auf anaerobe Glykolyse umstellen. Daraus entwickelt sich eine Azidose, die vor allem durch den vermehrten Anfall des Endprodukts der anaeroben Glykolyse, des Laktats, bedingt ist. Auf diesen Umstand hat ROSSITER bereits 1944 hingewiesen (80). Die Laktatazidose stimuliert das Nebennierenmark, wodurch vermehrt Noradrenalin freigesetzt wird. Diese Katecholaminfreisetzung verstärkt die sympathikotonen Folgen des Schockgeschehens. Katecholamine bewirken eine Degranulation der Mastzellen. Man muß annehmen, daß dies an den Stellen umso heftiger vonstatten geht, an denen man die größte sympathische Innervationsdichte findet. Dies ist im Splanchnikusgebiet der Fall, d.h., daß initial die Dünndarmschleimhaut besonders betroffen ist.

1.5.4. Strömungsverlangsamung

Im Gewebe und in den Gefäßen reichern sich vasodilatorisch wirkende Metaboliten an, die zur Hyperosmolarität im Gewebe führen und konsekutiv die maximale Weitstellung des Kapillarkreislaufs bedingen. Verstärkt wird dieser Prozeß durch die Leukodiapedese. Der bestehende niedrige pH verstärkt dabei die Proteinasefreisetzung, die den Abbau großmolekularer Proteine zur Folge hat. Die Spaltprodukte sind onkotisch stärker wirksam als das Makromolekül. Diese Tatsache wurde durch Untersuchungen über den kolloidos-

motischen Druck von GRÜNERT nachgewiesen (34).

Die eben beschriebene Strömungsverlangsamung durch maximale Weitstellung des Kapillarbettes folgt dem Gesetz von HAGEN und POISEUILLE, das der Arzt Poiseulle bereits im Jahr 1843, unabhängig vom Physiker Hagen, empirisch gefunden hat.

Entscheidend ist dabei die Abhängigkeit von der 4. Potenz des Radius des Gefäßsystems (31).

Diese Strömungsverlangsamung bewirkt das sogenannte "Plasmaskimming".

Darunter versteht man die mehr oder weniger starke Trennung von korpuskulären Blutbestandteilen und Plasma als Folge der Axialmigration der Erythrozyten (85). Senkrecht vom Gefäß abzweigende Kanillaren führen deswegen häufig nur Plasma, das aus dem erythrozytenfreien Randstrom abfließt. Dies zeigt, daß der Hämatokrit, der im venösen und arteriellen Schenkel bestimmt wird, keine Aussage über den Hämatokrit im Gewebe bei gestörter Mikrozirkulation erlaubt.

1.5.5. Proteolyse

Der bei der Blutgerinnung durch den Kontakt mit benetzbaren Oberflächen aktivierte Hagemannfaktor führt unter anderem zur Freisetzung folgender aktivierter Proteinase: Thrombin, Plasmin und Kallikrein. Ferner werden sowohl aus den durch die massive Verbrennung zerstörten Zellen sowie aus den durch Azidose geschädigten Zellen und Leukozyten lysosomale Proteinase freigesetzt. Viele dieser Proteinase bewirken wieder eine vermehrte Freisetzung von vasoaktiven Kininen. Als systemische Wirkung kommt es auch zur Ausschüttung eines lungenschädigenden Faktors (pulmonary lesion factor), dessen Ursprung unbekannt ist und der wahrscheinlich maßgebend an der Entstehung eines ARDS (adult respiratory distress syndrome) beteiligt ist (27).

Bei hoher proteolytischer Fermentaktivität, wie sie bei Verbrennungen entsteht, ergibt sich die Möglichkeit, daß die im Plasma vorhandenen Inhibitoren proteolytischer Enzyme, α_1 -Antitrypsin und α_2 -Makroglobulin, verbraucht werden. Es kommt dann zu einer massiven Schädigung des Organismus durch Fibrinolyseblutungen infolge Fibrinogenmangels, massiver Proteolyse und Sepsis bis hin zum oft letalen Ausgang.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde im zweiten Teil untersucht, ob es möglich ist, durch die Applikation eines neuen Proteinaseinhibitors in diesen Verlauf einzugreifen.

2. Eigene Untersuchungen

Problemstellung:

Sind lokale und systemische Veränderungen bei der Verbrennungskrankheit erklärbar durch Veränderungen der Proteinaseaktivität?

Saure Proteinasen:

Die Methode zur Bestimmung saurer Proteinasen ist hauptsächlich an die Bestimmung von Kathepsin D adaptiert; Hämoglobin ist ein geeignetes Substrat dafür.

Neutrale Proteinasen:

Nach den bisherigen Untersuchungen gibt es kein Enzym, das eine besondere Substratspezifität für Hämoglobin unter neutralen pH-Bedingungen besitzt. Von RIEKKINEN und RINNE ist eine neutrale Gehirnproteinase mit einer Substratspezifität für Casein und Hämoglobin beschrieben, die aus einer Rattengehirnfraktion stammte und ein pH-Optimum bei 7,0 bis 7,2 besaß. Die anderen beschriebenen Proteinasen, die bei neutralem pH-Wert wirksam sind, besitzen lediglich Gruppenspezifität.

OHLSSON beschreibt zwei Kollagenasen und drei Elastasen aus menschlichen Granulozyten, wobei die Kollagenasen ein Molekulargewicht von etwa 34000 und ein pH-Optimum von 8,5 aufweisen (72). Derselbe Autor beschreibt die drei Elastasen näher mit einem pH-Optimum von ebenfalls 8,5 und einem Molekulargewicht von 33000 bis 36000 (71). Seine Ergebnisse bestätigen die Untersuchungen von OUCHTERLONY, die dieser bereits 1948 veröffentlicht hatte (77). Die Ergebnisse der Aminosäurenanalyse zeigen aber, daß die chemischen Unterschiede zwischen den Enzymen sehr gering sind. Alle besitzen sie eine breite Substratspezifität und werden durch α_1 -Antitrypsin und α_2 -Makroglobulin inhibiert. Die Elastase ermöglicht unter anderem die Auflösung von Bakterienwänden. Ihr Hauptsubstrat sind jedoch die elastischen Fasern der Gewebe.

2.1. Material und Methode

Es wurden weibliche Sprague-Dawley-Ratten mit einem Durchschnittsgewicht von 220 g verwendet. Die drittgradigen Verbrühungen, die mittels Schablone 15 % der Körperoberfläche betrug, wurden durch Kontamination des Rückens mit 90 Grad C heißem Wasser für die Dauer von 15 Sekunden hervorgerufen. Zu diesem Zweck wurden die Tiere chemisch depiliert und mit Äther narkotisiert. Mittels einer eigens angefertigten Körperschablone wurde der Anteil der verbrühten Haut konstant gehalten. Die Tiere wurden bis zur Organentnahme unter aseptischen Bedingungen gehalten. Die Organentnahme erfolgte am ersten, dritten und fünften Tag nach der Verbrühung.

Entnommen wurden folgende Organe:

- Haut (Bauchhaut, vor Entnahme chemisch depiliert)
- Nekrose (verbrühte Rückenhaut)
- Leber
- Niere
- Milz
- Magen
- Lunge
- Muskel.

Die Tiere wurden zur Organentnahme entblutet und die entnommenen Organe sofort aufgearbeitet. Nach Herstellung einer Gewebesuspension 1 : 10 mit physiologischer Kochsalzlösung 0,9% wurden die Gewebesuspensionen mit einem Ultra-Turrax der Firma Janke und Kunkel 30 Sekunden lang unter Kühlung mit Eiswasser homogenisiert. Das Homogenat wurde mit 30000 g bei 4 Grad C 30 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde für die weiteren Untersuchungen als Enzymlösung verwendet.

Um die Aktivität der sauren Proteinase zu messen, wurde die Methode von WEBER (97), die auf der Methode von ANSON (1) basiert, verwendet. Als Substrat für die Enzymlösung wurde reines lyophilisiertes Rinderhämoglobin (Fa. Serva, Heidelberg) verwendet. Es wurde eine 8%ige Lösung (w/v) hergestellt. Als Pufferlösung wurde ein 1-molarer Natriumformiatpuffer mit einem pH von 3,0 benützt. Der Ansatz, der einen pH von 3,2 aufwies, setzte sich aus

0,25 ml Natriumformiat-Puffer
 0,25 ml Hämoglobin 8% und
 0,50 ml Enzymlösung

zusammen.

Der Ansatz wurde dann bei 45 Grad C für 90 Minuten inkubiert und die ablaufende Reaktion dann durch Zugabe von 5,00 ml Trichloressigsäure 3 % (TCA) gestoppt. Nach sorgfältiger Durchmischung wurde erneut für 10 Minuten inkubiert, bevor die Suspension filtriert wurde (Selecta Filter Nr. 595 1/2). Im klaren Filtrat wurde nun die Extinktion bei 280 nm gemessen. Nach BARRETT (9) erfolge als Definition einer Einheit der Enzymaktivität diejenige Menge Enzym, die einen Extinktionsanstieg von 1,000 im Ansatz pro Minute verursacht.

Für den Kontrollansatz wurde sofort nach Zugabe der Enzymlösung Trichloressigsäure zugesetzt und durchgemischt. Die Untersuchungslösungen wurden jeweils doppelt angesetzt und jedes Testfiltrat gegen das Leerfiltrat gemessen. Die Bestimmung des Proteingehaltes erfolgte nach der Biuret-Methode (Merck) von WEICHSELBAUM (98).

Die Ergebnisse wurden mit dem T-Test von STUDENT für unverbundene Stichproben mit ungleicher Varianz statistisch ausgewertet. Als Signifikanzniveau wurde $p < 0,05$ gewählt.

Zur Bestimmung der Aktivität der neutralen Proteinasen, die parallel zur Bestimmung der sauren Proteinasen durchgeführt wurde, entwickelte WEBER in Anlehnung an die Methode für saure Proteinasen eine Methode (97).

Als Pufferlösung dient hierbei ein 0,1-molarer Phosphat-Puffer mit einem pH-Wert von 7,6.

Der Versuchsansatz setzte sich aus

0,25 ml Phosphat-Puffer
 0,25 ml Hämoglobinlösung 8% und
 0,50 ml Enzymlösung

zusammen.

Das weitere Testverfahren ist mit der Methode zur Bestimmung der sauren Proteinasen identisch. Ebenso wie bei den sauren Proteinasen wurde die Aktivität als Units / Gramm Frischgewicht gemessen und die spezifische Aktivität als Units / mg Protein.

Die Auswertung erfolgte ebenso nach dem T-Test und als Signifikanzniveau wurde $p < 0,05$ festgesetzt.

2.2. Ergebnisse

2.2.1. Saure Proteinasen

Die Untersuchung der Aktivitätsänderung von sauren Proteinasen erfolgte in der Frühphase der Verbrennungskrankheit und zwar am ersten, dritten und fünften Tag nach dem Setzen der Verbrühung.

Bei den meisten Organen ließen sich zwischen dem ersten, dritten und fünften Tag nur geringe Änderungen der Aktivität der sauren Proteinasen nachweisen. Die Meßergebnisse der verbrühten Tiere wurden daher in ihrer Gesamtheit mit den Kontrolltieren verglichen.

Beim Organ Haut als lokal betroffenes Areal bei der Verbrühung kam es zu einem statistisch signifikanten Abfall der Proteinasenaktivität ($p < 0,0025$), bezogen auf Gramm Frischgewicht. Auch bei der spezifischen Aktivität ließ sich ein signifikanter Abfall der Aktivität nachweisen ($p < 0,005$).

Beim Vergleich der gesunden Haut der Kontrolltiere mit der Nekrose verbrühter Tiere ließ sich ein ebenfalls signifikanter Abfall der Proteinasenaktivität nachweisen ($p < 0,005$). Statistisch signifikant war auch der Abfall der spezifischen Aktivität in der Nekrose, verglichen mit der Haut der Kontrolltiere ($p < 0,0025$).

Bei der Leber fiel die Aktivität der sauren Proteinasen (U/g FG) signifikant ($p < 0,01$) ab; bezogen auf mg Protein war der Abfall nicht signifikant. Die Ergebnisse bei der Niere waren nicht signifikant.

Die Milz nimmt eine Sonderstellung ein. Bei diesem Organ war am ersten Tag nach der Verbrühung ein signifikanter ($p < 0,025$) Anstieg, bezogen auf Gramm Frischgewicht, nachzuweisen. Die Erhöhung der Aktivität am ersten Tag war auch gegenüber dem dritten Tag signifikant erhöht, nicht jedoch gegenüber dem fünften Tag. Am fünften Tag kam es wieder zu einem Enzymanstieg, der im Vergleich zu den Kontrolltieren aber nicht signifikant war. Auch der Vergleich der Gesamtheit der verbrühten Tiere mit der Kontrollgruppe war signifikant. Bei der spezifischen Aktivität war der Anstieg ebenfalls statistisch signifikant ($p < 0,01$).

Bei der Untersuchung des Magens war das Aktivitätsniveau sowohl bezogen auf Gramm Frischgewicht wie auch auf mg Protein signifikant gegenüber der Kontrollgruppe erhöht ($p < 0,005$ bzw. $< 0,0005$).

Der Vergleich der Gesamtheit der verbrühten Tiere mit der Kontrollgruppe

zeigte bei der Lunge einen Anstieg, der aber nicht signifikant war. Beim Vergleich der Aktivitätsänderungen in der Muskulatur war keine wesentliche Änderung zu beobachten.

Tabelle I

Vergleich der Kontrolltiere mit den verbrühten Tieren; saure Proteinasen I/p-Frischgewicht

Organ	Kontrolltiere		verbrühte Tiere		p
	n	$\bar{x}$	n	$\bar{x}$	
Haut	19	6,637	15	4,791	0,0025
Nekrose					
Leber	19	10,555	11	2,811	0,05*
Niere	21	14,093	15	9,016	0,05
Milz	21	16,976	15	15,295	0,1
Magen	14	23,457	15	19,360	0,005
Lunge	6	8,371	15	25,548	0,005
Muskel	7	2,962	15	10,409	0,05
			14	2,911	0,1

* Vergleich: Nekrose - "gesunde" Haut der verbrühten Tiere

** Vergleich: Nekrose - Haut der Kontrolltiere

Abbildung I

Vergleich: Kontrolltiere - verbrühte Tiere, saure Proteinase

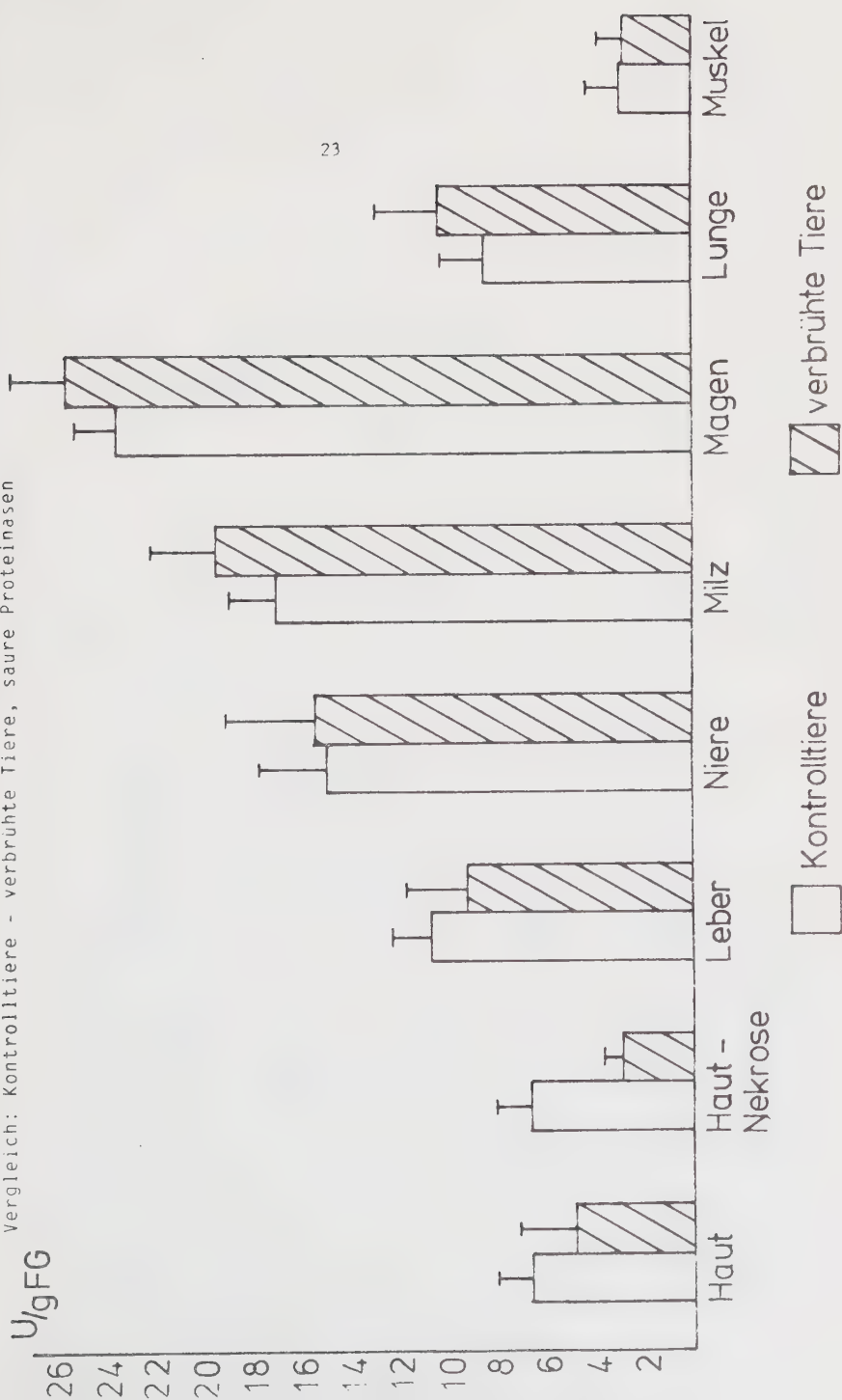


Tabelle II

Vergleich der Kontrolltiere mit den verbrühten Tieren: saure Proteinase 11/mg Protein

Organ	Kontrolltiere		verbrühte Tiere		p
	n	$\bar{x}$	n	$\bar{x}$	
Haut	18	230,72	14	98,00	0,005
Nekrose					
Leber	19	92,11	15	85,87	0,1*
Niere	19	199,26	15	219,13	0,1
Milz	20	169,25	15	211,60	0,01
Magen	12	452,83	15	905,86	0,005
Lunge	6	122,46	14	149,25	0,1
Muskel	6	59,55	14	66,36	0,1

* Vergleich: Nekrose - "gesunde" Haut der verbrühten Tiere

** Vergleich: Nekrose - Haut der Kontrolltiere

Abbildung II

Vergleich: Kontrolltiere - verbrühte Tiere;
saure Proteinase

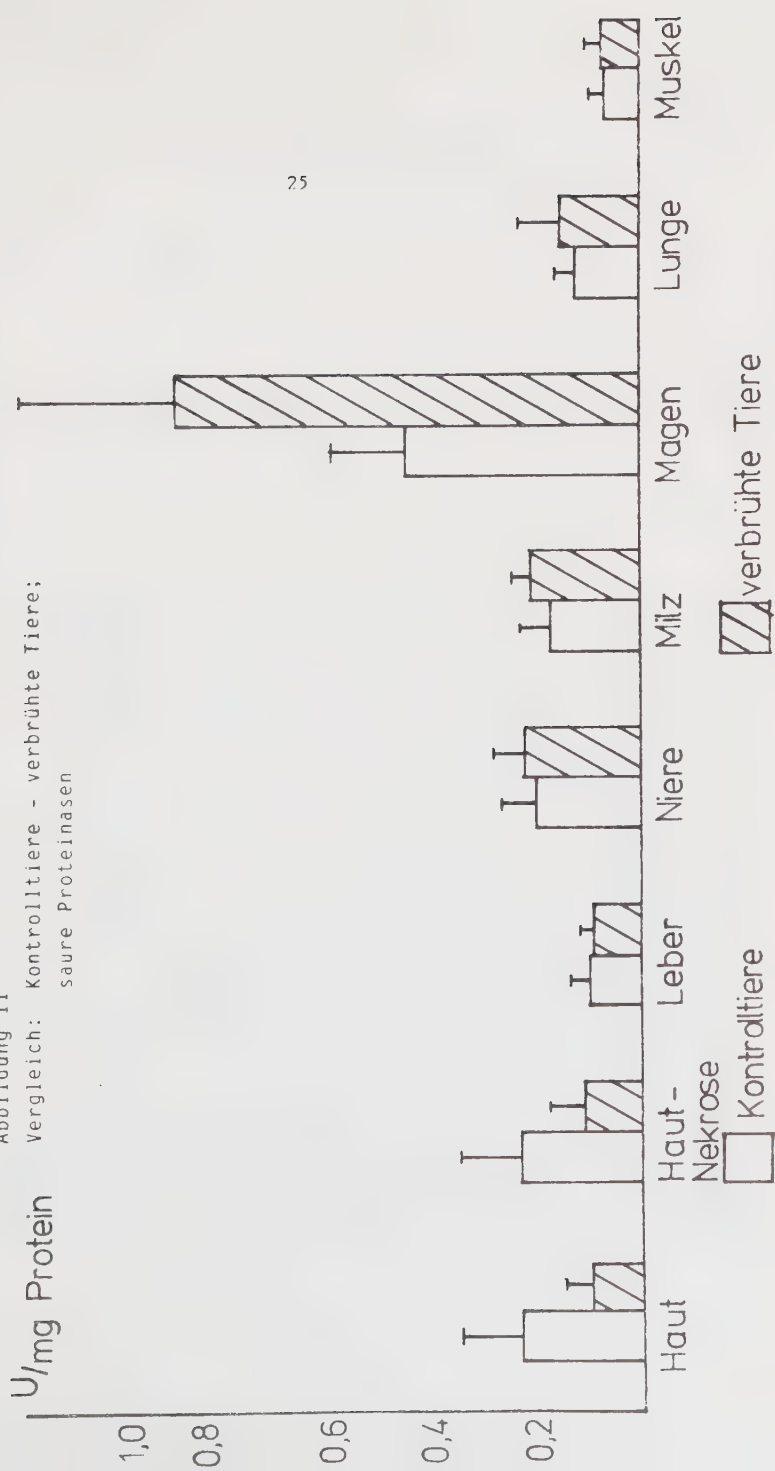


Tabelle I a

Vergleich: Kontrolltiere - verbrühte Tiere
saure Proteinase, U / g Frischgewicht
Organentnahme erster Tag

	Kontrolltiere			verbrühte Tiere			Signifikanz
	n	$\bar{x}$	s	n	$\bar{x}$	s	p
Milz	21	16,976	2,158	5	20,973	2,752	0,025

2.2.2. Neutrale Proteinase

Das Aktivitätsniveau der neutralen Proteinase lag insgesamt niedriger als das der sauren. Bei der Haut, dem bei der Verbrühtung primär geschädigten Organ, waren keine signifikanten Änderungen zu verzeichnen. Vergleich man jedoch den Nekrosebereich mit der "gesunden" Haut der verbrühten Tiere wie mit der Haut der Kontrolltiere, so waren signifikante Abfälle der Enzymaktivitäten nachweisbar.

Die Leber zeigte einen Aktivitätsanstieg, sowohl bezogen auf Gramm Frischgewicht wie auf mg Protein, der signifikant war ($p < 0,005$ bzw. $0,0025$).

Dem geringen Anstieg der Aktivität der Niere (U/g FG) stand ein signifikanter Anstieg der spezifischen Aktivität gegenüber ($p < 0,05$). Eine signifikante Erhöhung des proteolytischen Potentials der Milz war, bezogen auf Gramm Frischgewicht wie auch als spezifische Aktivität, nachweisbar.

Beim Magen kam es zu keiner signifikanten Änderung der Gesamtaktivität, jedoch zu einer sehr großen Zunahme der spezifischen Aktivität der neutralen Proteinase ($p < 0,0005$).

Der Enzymanstieg in der Lunge war bei der Gesamtheit der verbrühten Tiere nicht signifikant. Betrachtet man jedoch den Aktivitätsanstieg am ersten Tag, so ist die Erhöhung signifikant ($p < 0,0025$). Keine Veränderungen zeigten sich dagegen bei der spezifischen Aktivität der Lunge. Die Veränderungen in der Muskulatur waren sehr gering und nicht signifikant.

Tabelle III

Vergleich: Kontrolltiere - verbrühte Tiere: neutrale Proteinase, U/g Frischgewicht

Organ	Kontrolltiere			verbrühte Tiere			p
	n	$\bar{x}$	s	n	$\bar{x}$	s	
Haut	18	1,797	1,34	14	1,856	0,66	> 0,1
Nekrose				15	0,774	0,34	< 0,005* < 0,0025**
Leber	23	7,364	1,11	15	8,582	1,33	< 0,005
Niere	21	3,636	0,83	15	4,008	0,65	> 0,1
Milz	20	6,095	1,27	15	6,889	0,59	< 0,025
Magen	15	3,083	1,04	15	3,251	0,91	> 0,1
Lunge	7	2,876	1,20	15	3,109	0,53	> 0,1
Muskel	6	0,470	0,19	15	0,336	0,20	> 0,1

* Vergleich: Nekrose - "gesunde" Haut der verbrühten Tiere

** Vergleich: Nekrose - Haut der Kontrolltiere

Abbildung III

Vergleich: Kontrolltiere - verbrühte Tiere; neutrale Proteinasen

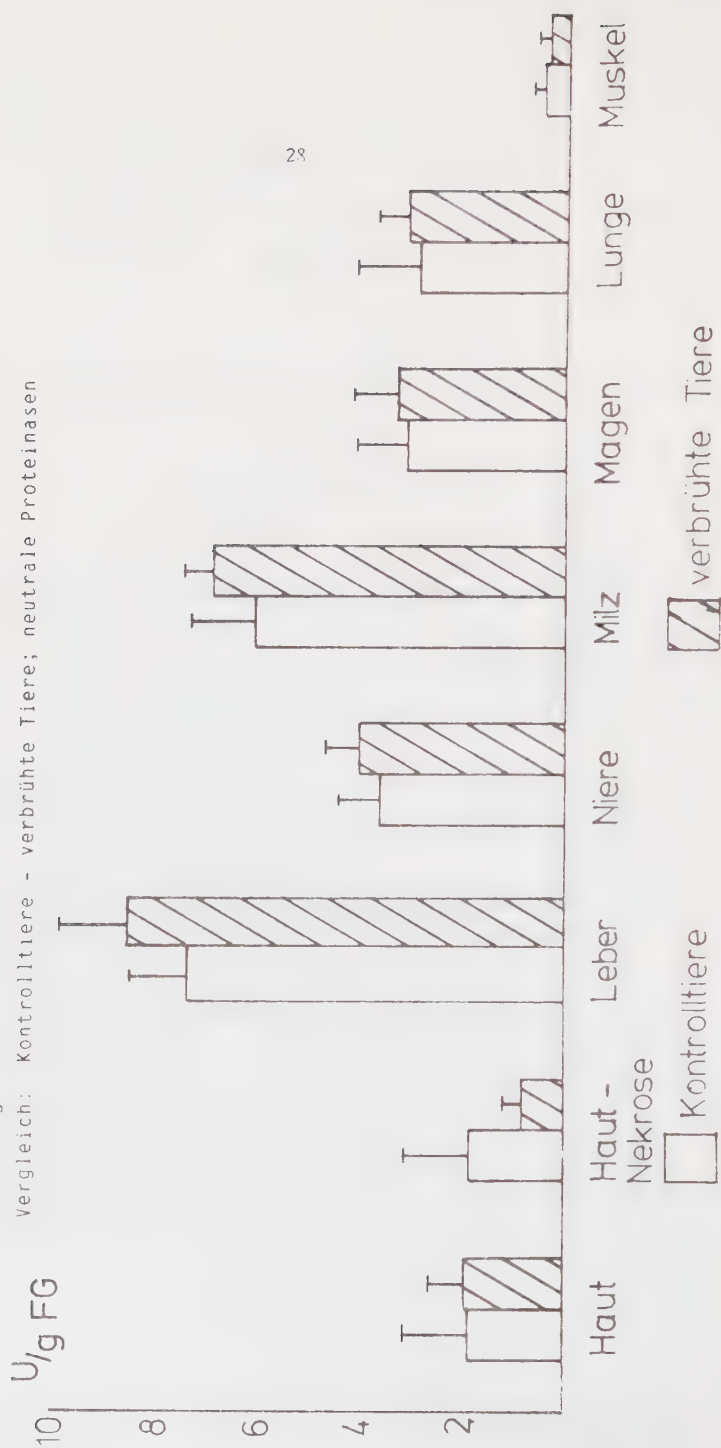


Tabelle IV

Vergleich: Kontrolltiere - verbrühte Tiere; neutrale Proteinasen, 11/mg Protein

Organ	Kontrolltiere			verbrühte Tiere		
	n	$\bar{x}$	s	n	$\bar{x}$	s
Haut	17	53,58	45,65	14	40,28	18,93
Nekrose				15	26,00	14,16
Leber	23	61,91	21,65	15	82,86	15,73
Niere	20	45,85	18,15	15	58,26	18,92
Milz	19	59,57	22,34	15	76,13	14,38
Magen	15	60,86	26,90	15	111,03	34,80
Lunge	7	44,00	23,29	14	45,39	18,51
Muskel	6	8,16	3,75	15	7,74	6,38

* Vergleich: Nekrose - "gesunde" Haut der verbrannten Tiere

**** Vergleich: Nekrose - Haut der Kontrolltiere**

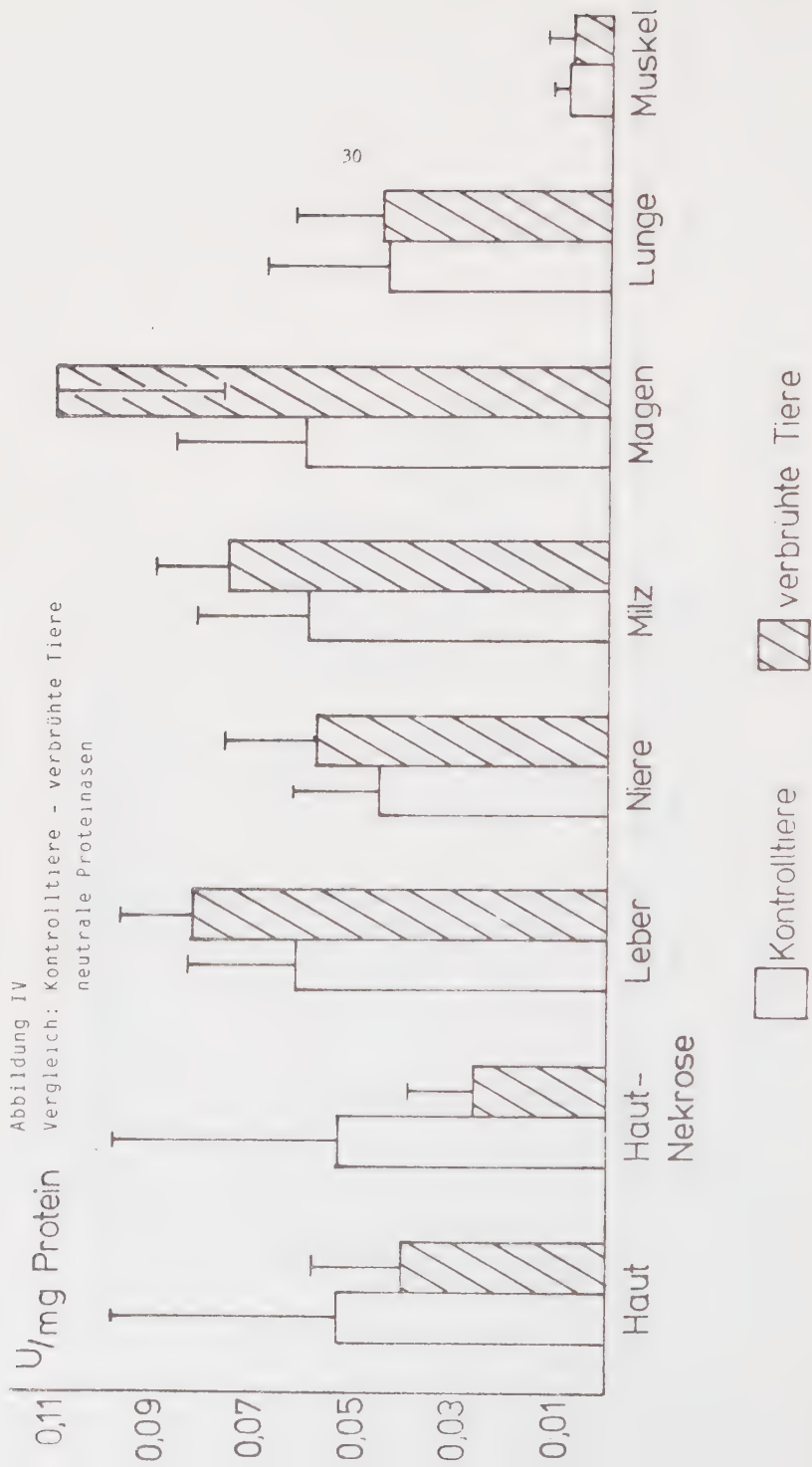


Tabelle III a

Vergleich: Kontrolltiere - verbrühte Tiere
 Organentnahme erster Tag
 neutrale Proteinase: U / g Frischgewicht

	Kontrolltiere			verbrühte Tiere			Signifikanz
	n	$\bar{x}$	s	n	$\bar{x}$	s	p
Lunge	7	2,867	1,20	5	3,588	0,16	0,0025

2.3. Diskussion

Die Methode zur Bestimmung saurer Proteinase ist hauptsächlich an die Bestimmung von Kathepsin D adaptiert. Bei der benützten Versuchsanordnung ist jedoch eine Interferenz in der Analyse mit Pepsin beim Magen nicht auszuschließen. Die Ergebnisse für den Magen sind daher mit Zurückhaltung zu interpretieren. Die Ergebnisse zeigen jedoch in ihrer Gesamtheit, daß in allen Organen, mit Ausnahme der Muskulatur, ein hohes proteolytisches Potential vorhanden ist.

Die Pathogenese der Verbrennungskrankheit zeigt Veränderungen im Stoffwechsel der Organe und in ihrer morphologischen Struktur. So fand KOHLER eine Einschränkung der Proteinsynthese und eine Verminderung des ATP/ADP-Quotienten in der Rattenleber nach Verbrühung. Auch ARTURSON konnte einen ATP-Abfall nachweisen (5). Eine generalisierte katabole Stoffwechsellaage zeigte sich auch bei den eigenen Untersuchungen; anhand der Aktivitätsanstiege in Organen und Geweben, die fern vom Ort der Verbrühung liegen, ist diese Tatsache nachweisbar. Zu einem Anstieg der Aktivität der sauren Proteinase kam es bei den vom Schockgeschehen besonders betroffenen Organen Nieren, Milz, Magen und Lunge, wobei beim Magen aus methodischen Gründen Interferenzen mit Pepsin nicht auszuschließen sind. Der deutliche Anstieg in der spezifischen Aktivität der sauren Proteinase beim Magen ist sicherlich als Ausdruck einer Streßreaktion zu werten.

Der deutliche Anstieg der sauren Proteinaseaktivität bei der Milz und insbesondere am ersten Tag nach Setzen der Verbrühung ist als Ausdruck des hohen Granulozytenpools dieses Organs zu werten; im Rahmen der Entzündungsreaktion kommt es zu einer vermehrten Freisetzung von Enzymen aus den Lysosomen.

Auch der Aktivitätsanstieg der sauren Proteinase der Lunge, aber auch der statistisch signifikante Anstieg der neutralen Proteinase am ersten Tag nach der Verbrennung ist ein Ausdruck für die zentrale Stellung im Schockgeschehen, die dieses Organ nicht nur beim Verbrennungsschock einnimmt. Dabei kommt es häufig zum Mehrfachorganversagen, und das Lungenversagen imponiert klinisch als "adult respiratory distress syndrome" bzw. ARDS genannt.

In der Nekrose fand sich erwartungsgemäß eine verminderte Enzymaktivität in beiden pH-Bereichen. Bei den Bestimmungen der neutralen Aktivität der Haut fand sich ein leichter Anstieg, wohingegen es im sauren pH-Bereich zu einem deutlichen Abfall kam.

Bei Niere und Milz waren im neutralen Bereich keine signifikanten Aktivitätsänderungen zu beobachten, während es bei Leber und Magen zu einem deutlichen Anstieg der Aktivitäten kam. Der bereits erwähnte Anstieg der neutralen Proteinaseaktivität in der Lunge am ersten Tag könnte ein Hinweis auf einen frühen Auslösemechanismus eines ARDS sein.

Lediglich in der Muskulatur ließen sich weder bei den sauren noch bei den neutralen Proteinase nennenswerte Aktivitätsänderungen nachweisen.

Peptid-Hydrolasen sind in Lysosomen lokalisiert. Ultrastrukturelle Untersuchungen durch PELLEGRINI und FRANZINI (1963) ergaben, daß Lysosomen im Muskel nicht vorkommen. Damit ist eine Erklärung für das Ausbleiben von Aktivitätsänderungen in der Muskulatur gegeben.

Die Verbrühung von 15 % der Körperoberfläche zeigt bei allen Untersuchungen eine Reaktion des Gesamtorganismus als Ausdruck eines komplexen Geschehens beim Schock. Die einzelnen Organe reagieren unterschiedlich auf das Trauma. Beim Verbrennungsschock nimmt das Organ "Haut" sicherlich eine Sonderstellung als primär geschädigtes Organ ein, wie aus den Veränderungen im Enzymmuster zu ersehen ist. Daneben zeigen eine Reihe von Organen im Rahmen des Schockgeschehens deutliche Veränderungen. Dabei wiesen Milz und Magen im sauren Bereich eine deutliche Änderung auf, während im neutralen Bereich

Leber, Milz, Niere und Lunge neben dem Organ Haut dominieren. Insgesamt zeigt sich in den Untersuchungen die zentrale Rolle der Organe Leber, Niere, Milz, Magen und Lunge im Ablauf eines Schockgeschehens.

Sind Proteinasen wesentlich am Ablauf des Schockgeschehens beteiligt, so sollte sich dies durch eine Inhibition der Enzyme modulieren lassen. Zur Abklärung war die Prüfung an einem Schockmodell notwendig, das einen klinisch möglichst einheitlichen Verlauf zeigt.

3. Einleitung

3.1. Experimentell erzeugte Peritonitis als Modell eines septischen Schocks.

Um den Proteinaseinhibitor Pepstatin erfolgversprechend einsetzen zu können, wurde an Meerschweinchen ein Modell eines septischen Schocks entwickelt. Dabei wurde durch eine intraperitoneale Injektion einer Suspension von *E. coli* eine iatrogene Peritonitis erzeugt.

Nach einem Zeitalter der Anwendung synthetischer Vasopressoren sind wir immer noch mit derselben Mortalitätsrate von ca. 70 % beim Schock durch bakterielle Sepsis konfrontiert. Eine deutliche Reduktion der Letalitätsrate der verschiedenen Schockformen gelang nur beim isolierten Volumenmangel-schock; allerdings nicht durch die Anwendung neuer Medikamente, sondern durch suffiziente Volumensubstitution, bestehend aus Kristalloiden, Kolloiden, Plasma- und Blutderivaten.

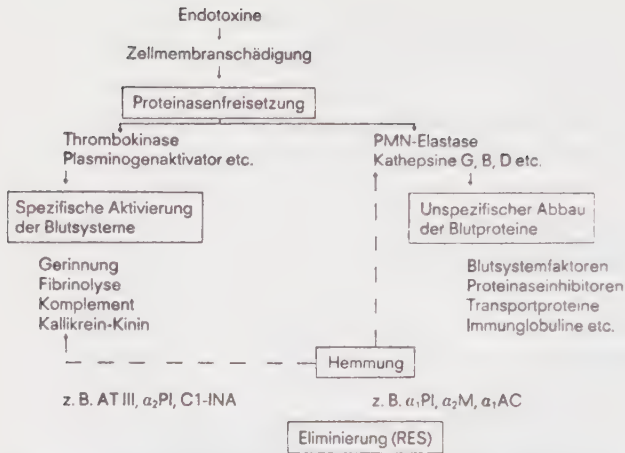


Abb. 6: Pathobiochemische Reaktionen bei gramnegativer Sepsis.
(aus: Jochum, M. und Mitarbeiter: Elastase- α_1 -Proteinaseinhibitor-
komplex. 1983 (45))

Die häufigste Ursache eines septischen Schocks sind Infektionen mit gramnegativen Erregern. Die gramnegativen Bakterien - E. coli, Klebsiellen, Pseudomonas, Proteus u.a. - enthalten einen Lipopolysaccharidkomplex in ihrer Zellwand, der als Endotoxin bezeichnet wird. Beim Absterben des Bakteriums wird nun das Endotoxin freigesetzt. Die pathophysiologischen Veränderungen während eines Sepsis lassen sich in drei große Komplexe einteilen: Veränderungen der Hämodynamik, immunologische Veränderungen und pathobiochemische Veränderungen.

3.2.1. Veränderungen der Hämodynamik

Schocksymptome als Ursache der gramnegativen Sepsis wurden erstmals von WAISBREN detailliert beschrieben (96). Sie wurde bis heute von zahlreichen Arbeitsgruppen experimentell und klinisch untersucht (41). Die Kreislaufregulationsstörungen laufen in deutlich voneinander abgrenzbaren Phasen ab (65).

Erste Phase: Hyperdynamie Phase

Systemische Einschwemmung von Endotoxin führt zunächst zur Abnahme des peripheren Gefäßwiderstandes durch Erweiterung der terminalen Strombahn.

Als Ursachen werden diskutiert:

Histamin- und β -Endorphinfreisetzung (79), Komplementaktivierung mit Bildung vasoaktiver Substanzen und Aktivierung von Kallikrein.

Zweite Phase: Venöses Pooling im Splanchnikusgebiet und Zunahme der Gefäßwandpermeabilität

Histamin bewirkt über eine Vasokonstriktion der zentralen Venen und der Lebervenen eine lokale Blutansammlung im Splanchnikusgebiet. Daraus resultiert eine deutliche Reduktion des venösen Rückstroms zum Herzen.

Dritte Phase: Hypodynamie Phase

Die Verminderung des venösen Rückstroms und die Erhöhung des pulmonalarteriellen Druckes führen zu einer Abnahme des Herzzeitvolumens. Über Barorezeptoren im linken Vorhof und im Aortenbogen wird das sympathiko-adrenerge System aktiviert, wodurch vor allem postkapilläre Gefäße im venösen System kontrahieren. Damit ist der Circulus vitiosus einer meist irreversiblen Organschädigung eingangsgesetzt. Die alleinige Verantwortung der Katecholamine für die Erhöhung des peripheren Widerstandes kann heute nicht mehr unumstritten bleiben, da im Tierversuch eine α -blockierende Medikation nicht die postkapilläre Konstriktion verhindert. HESS und Mitarbeiter fanden als wesentlichen Mediator das Angiotensin (41). GROSS zeigte eine Hemmung der Renin-Angiotensinogen-Reaktion beim Schwein bei pH 7,4 durch den Proteinaseinhibitor Pepstatin (33).

Ultrastrukturelle Untersuchungen von HEINE zeigen eine zentrale Stellung des Alveolarendothels (40). Es ist in der Lage, bereits bei einer Passage 90 % der zirkulierenden Prostaglandine, mit Ausnahme des Prostazyklins, zu verstoffwechseln. An der Oberfläche dieser Zellen findet sich auch das Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE), das Angiotensin I in Angiotensin II umwandelt. Neben seiner gefäßkontrahierenden Wirkung setzt Angiotensin II Aldosteron aus der Nebennierenrinde frei, das dann an den proximalen Tubuli der Niere Natrium und Wasser rückresorbieren hilft. Daraus geht

die enorme Bedeutung des Alveolarendothels im Schockgeschehen hervor, da es die Funktion der Nieren entscheidend mit beeinflußt.

Vierte Phase: Myokardiale Depression

Schon zu Beginn des venösen Poolings tritt eine zusätzliche Funktionsstörung des Myokards auf. Es wurde die Existenz eines "Myocardial depressant factor" (MDF) postuliert, über dessen Nachweis in der Literatur aber kontrovers diskutiert wird (41).

Fünfte Phase: Pulmonale Hypertonie

In jeder der bisher beschriebenen Phasen kommt es zu charakteristischen Veränderungen in der pulmonalen Strombahn (20). Als Frühsymptom gilt eine Abnahme des pulmonal-vaskulären Widerstandes mit einer Zunahme des Rechts-Links-Shunts. Im weiteren Verlauf steht aber die Erhöhung des pulmonal-vaskulären Widerstandes im Vordergrund, und der Druck der Arteria pulmonalis steigt an. Die Prognose der pulmonalen Hypertonie ist ähnlich schlecht wie die der hypodynamen Phase im systemischen Kreislauf. Morphologisch ist die Ruptur der sogenannten "leakagejunctions" zwischen den Epithelzellen mit konsekutivem Flüssigkeitseinstrom in das Interstitium durch vermehrt am Endothel haftende polymorphkernige Granulozyten (PMN) als Frühsymptom nachweisbar (39). Verantwortlich für die Ruptur wären demnach vermehrt freigesetzte Leukozyten-Proteinasen. Neue Untersuchungen zur pulmonalen Hypertonie stammen von OETTINGER (70): bei Patienten mit gramnegativem septischen Schock war eine deutlich verminderte Inaktivierung vasopressorisch wirksamer Prostaglandine ($PG F_{2a}$) bei gleichzeitig vorliegendem respiratorischen distress syndrome (ARDS) meßbar, was den Pathomechanismus der pulmonalen Hypertonie zumindest unterhalten könnte. Als therapeutischer Ansatz zeigen sich neben den bisher bekannten Möglichkeiten (invasives Monitoring, Volumentherapie, frühzeitige Beatmung, Heparinisierung, Thrombozytenaggregationshemmer, membranprotektive Substanzen wie Glukokortikoiden) neue Wege wie der Einsatz von Prostazyklin zur selektiven Erweiterung der pulmonalen Strombahn und der Einsatz von Proteinaseinhibitoren.

3.2.2. Immunologische Veränderungen während des septischen Schocks

Der menschliche Organismus hat zur Abwehr akuter bakterieller Infektionen folgende Mechanismen zur Verfügung (ausführliche Übersicht bei KLEBANOFF und CLARK (51)):

- a) Chemotaxis mobiler Phagozyten
- b) Opsonisierung
- c) Adhärenz der Bakterien an die phagozytierende Zelle
- d) Aufnahme des Bakteriums in die Zelle
- e) Intrazelluläre Abtötung des Bakteriums.

Wichtigstes Abwehrorgan gegen bakterielle Infektionen sind die phagozytierenden Zellen (88). Die Phagozytose wird unterstützt durch die Fähigkeit der Zellen zur Chemotaxis. Als potente Chemotaxine sind der aktivierte Hagemann-Faktor (Faktor XII a) und die Komplementfaktoren C3a und C5a bekannt. Spezifische Antikörper der 7S-IgG-Globuline und der Komplementfaktor C3b schaffen die optimale Voraussetzung für die Phagozytose des Bakteriums (Opsonisierung), da PMN-Granulozyten und Makrophagen an ihrer Zelloberfläche Rezeptoren für IgG-Fc und C3b aufweisen.

Dabei sind die IgG-Fc-Rezeptoren für die Ingestion und die C3b-Rezeptoren für die Adhäsion verantwortlich.

Die intrazelluläre Bakterizidie ist von der Konzentration bakteriotoxischer Stoffe in den Phagozyten abhängig. Spezifische und unspezifische Granula verschmelzen mit der Vakuolenmembran und geben ihren Inhalt in die Vakuole ab. Spezifische Granula enthalten als neutrale Proteinase eine Kollagenase, eine weitere kollagenolytische Metalloproteinae sowie Lysozyme.

Aus azidophilen Granula wurden sowohl saure Hydrolasen als auch neutrale Proteinasen wie Elastase und Kathepsin G isoliert (8).

3.2.3. Pathobiochemische Veränderungen während des septischen Schocks.

Der Verlauf einer Sepsis wird sehr häufig kompliziert durch folgenschwere pathobiochemische Prozesse in der Zirkulation wie anaphylaktische Reaktionen, ausgelöst durch Aktivierung des Komplementsystems und den Verbrauch von Gerinnungsfaktoren bei der disseminierten intravasalen Gerinnung.

Endotoxine werden beim Zerfall der Mikroorganismen in das umgebende Medium freigesetzt und lösen dort eine Vielzahl von Reaktionen aus, wobei Zellbestandteile einschließlich lysosomaler Enzyme als sogenannte "Mediatoren der Entzündung" liberiert werden (36). Die normale Funktion der lysosomalen Enzyme besteht im Abbau von phagozytiertem Material. Gelangen sie jedoch in großer Menge in den Kreislauf, so verstärken sie die Entzündungsreaktion durch spezifischen und unspezifischen Abbau von Plasmaproteinen.

Befund:

Aktivierung der Blutsysteme:
Gerinnung, Fibrinolyse, Komplement,
Kallikrein-Kinin-System

Ursache:

Membranläsionen durch
Endotoxin an Endothel-
zellen, Thrombozyten,
Granulozyten usw.

Tab. 2: Spezifischer Abbau von Plasmaproteinen, modifiziert
nach DUSWALD (23)

Befund:

Proteolyse von Plasma-
proteinen der Gerinnung,
der Fibrinolyse, von
Transportproteinen, Pro-
teinaseninhibitoren,
Immunglobulinen.

Ursache:

Proteinasenfreisetzung
durch Endotoxin aus
polymorphkernigen Granu-
lozyten und anderen
Zellen: Elastase, Kolla-
genase, Kathepsine.

Tab. 3: Unspezifischer Abbau von Plasmaproteinen, modifiziert
nach DUSWALD (23)

Als Therapie gegen die Wirkungen der freigesetzten Proteinase ist im theoretischen Ansatz die Applikation von Proteinaseinhibitoren logisch und erfolgversprechend.

In Untersuchungen von JOCHUM und Mitarbeitern (43) wurde in vitro festgestellt, daß die systemunspezifischen Proteinase aus PMN-Granulozyten nahezu alle Proteine der Blutsysteme wie auch Transportproteine, Immunglobuline und auch Proteinaseinhibitoren abbauen.

In vivo wird die Aktivität durch Komplexbindung mit endogenen Inhibitoren vermindert. Während einer Sepsis beobachtet man jedoch eine Verminderung von Faktoren der Blutgerinnung, eine Aktivierung des Fibrinolysesystems sowie einen Verbrauch an Komplementfaktoren, Immunglobulinen und Proteinaseinhibitoren, so daß von einer permanenten Freisetzung von unspezifischen Proteinase während einer Sepsis ausgegangen werden kann.

Die pathobiochemischen Veränderungen im Verlauf einer Sepsis weisen darauf hin, daß das endogene Inhibitorsystem des Organismus überfordert sein könnte infolge einer massiven Freisetzung von Proteinase. Die Anwendung geeigneter exogener Proteinaseinhibitoren wäre ein erfolgversprechender Weg zur Verbesserung der bisherigen Therapieschemata.

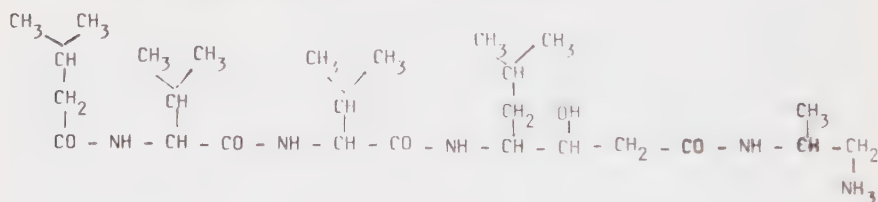
Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen wurde der Proteinaseinhibitor Pepstatin als stärkster bekannter Hemmstoff saurer Proteinase vom Kathepsin D-Typ bei experimentell erzeugter Peritonitis eingesetzt.

3.3. Pepstatin

3.3.1. Molekülaufbau und chemische Struktur

Pepstatin wurde von UMEZAWA und Mitarbeitern als Stoffwechselprodukt von Aktinomyzeten gefunden (93). Unter der Annahme, daß Mikroorganismen Proteinaseninhibitoren bilden müssen, da sie eine Reihe von katabolen proteolytischen Enzymen produzieren, gelang es, noch weitere Inhibitoren zu isolieren: Leupeptin (3,46) und Chymostatin (94). Nach chromatographischer Reinigung wurde Pepstatin als farblose Kristalle mit einem Schmelzpunkt bei 228 Grad C isoliert (93). Pepstatin ist unlöslich in Wasser, Äther und Chloroform, aber sehr gut löslich in Methanol, weniger gut in Äthanol und Essigsäure. Auf Grund massenspektrographischer Untersuchungen zeigte sich, daß Pepstatin keine freie Aminogruppe besitzt.

Es ist eine Pentapeptid, dessen N-terminales Ende durch einen Isovaleriansäurerest maskiert ist. Es ergab sich folgender Molekülaufbau:



Die weitere Suche ergab noch mehrere Pepstatinderivate: Pepstatin B und C sowie Pepstanone A. Das bisher erwähnte Pepstatin erhielt die Bezeichnung Pepstatin A (95).

Eine wesentliche Änderung der chemischen und physikalischen Eigenschaften ergab sich dabei nicht. Erst KAY und Mitarbeitern gelang es 1982, ein wasserlösliches Pepstatinderivat zu isolieren (47).

3.3.2. Biochemische Eigenschaften

Der inhibitorische Effekt des Pepstatins auf Pepsin ist seit den Untersuchungen von KUNIMOTO aus den Jahren 1972 und 1974 bekannt (54, 55). Er folgt stöchiometrischen Gesetzmäßigkeiten.

Nach einer modifizierten ANSON-Methode mit Casein als Substrat wurde von UMEZAWA und Mitarbeitern die Hemmung des Pepsins untersucht (93). 0,001 $\mu\text{g/ml}$ Pepstatin zeigte dabei eine 50%ige Hemmung des Pepsins in einer Konzentration von 4 $\mu\text{g/ml}$ im Ansatz. Da saure Proteinasen eine ähnliche Substratspezifität wie Pepsin aufweisen, wurde von IKEZAWA und Mitarbeitern die Hemmung von Kathepsin A, B und D durch Leupeptin, Chymostatin und Pepstatin untersucht (42).

Dabei fand sich eine spezifische Hemmung von Kathepsin D durch Pepstatin.

Kathepsin	LD_{50} ($\mu\text{g/ml}$)		
	Leupeptin	Chymostatin	Pepstatin
A	1680	62,5	125
B	0,44	2,6	125
D	109	49,0	0,011

Tab. 4: Hemmung von Kathepsin A, B und D durch Leupeptin, Chymostatin und Pepstatin.

(aus: IKEZAWA, H. e.a.: Effect of protease inhibitors of actinomycetes on lysosomal peptide-hydrolases from swine liver (42).

Bereits 1970 wurde von UMEZAWA ein hemmender Effekt auf Entzündungen, die durch Carrageenin hervorgerufen wurden, beschrieben (93, 96).

Eine intraperitoneale Injektion von 1,25 mg/kg KG von Pepstatin besitzt auch eine sehr geringe Toxizität. Die LD_{50} für intraperitoneale Applikation liegen für Mäuse bei 1090 mg/kg; für Ratten bei 875 mg/kg, für Kaninchen bei 820 mg/kg und für Hunde bei 450 mg/kg KG. Die oralen LD_{50} -Werte betragen nach UMEZAWA über 2000 mg/kg für alle Arten (93). Auch hohe Dosen bei oraler Anwendung über 180 Tage zeigten keine toxischen Wirkungen. Mittels radioaktiv markierten Pepstatins konnte UMEZAWA nachweisen, daß bei oraler Aufnahme über 90 % in den Faeces ausgeschieden werden. Nach intraperitonealer Applikation von 50 mg/kg bei Ratten oder Hunden

fanden sich nach 6 - 24 h Serumspiegel von 5 - 10 $\mu\text{g/ml}$ (93).

4. Eigene Untersuchungen

Problemstellung: Ist die Wirkung des Proteinaseinhibitors Pepstatin auf Proteinasen bei experimentell erzeugter Peritonitis als Modell eines septischen Schocks nachweisbar und ergeben sich klinisch relevante Ergebnisse in Form einer Verlängerung der Lebenszeiten der Tiere?

4.1. Material und Methode

Es wurden Meerschweinchen mit einem Durchschnittsgewicht von 390 g verwendet. Zur Erzielung einer Peritonitis erfolgte täglich eine intraperitoneale Injektion einer Suspension von *Escherichia coli*, Typ O 111.

Es wurden immer drei Tiere gleichzeitig mit *E. coli* behandelt und jeweils einer Gruppe zugeordnet, Gruppe 0, Gruppe I und II.

Die Tiere der Gruppe 0 erhielten täglich eine intraperitoneale Injektion von 1,00 ml einer *E. coli*-Suspension, die eine Keimdichte von 10^6 Keimen/ml aufwies. Die gesamte Injektionsmenge betrug 5,00 ml, die sich für die Tiere der Gruppe 0 folgendermaßen zusammensetzte:

1,00 ml *E. coli*-Suspension, Keimdichte $10^6/\text{ml}$

4,00 ml physiologische Kochsalzlösung mit 20 % Methanol.

Parallel dazu wurden zwei Tiere mit einer *E. coli*-Suspension und Pepstatin behandelt. Die Injektionsmenge betrug ebenfalls 5,00 ml und setzte sich aus

1,00 ml *E. coli*-Suspension, Keimdichte $10^6/\text{ml}$,

4,00 ml einer 10^{-4} -molaren Pepstatinlösung zusammen.

Eine 10^{-4} -molare Pepstatinlösung hat eine Konzentration von 0,0686 mg/ml.

Die mittlere Dosis für die Tiere betrug demnach 0,9 mg/kg KG. Das Pepstatin wurde in physiologischer Kochsalzlösung mit 20 % Methanol gelöst. Der Methanolzusatz diente dabei wegen der schlechten Wasserlöslichkeit des Pepstatins als Lösungsvermittler.

Zum Zeitpunkt des Todes der Tiere der Gruppe 0 wurden diese Tiere entblutet und folgende Organe entnommen:

- Haut (Rauchhaut, chemisch depiliert)

- Leber
- Niere
- Milz
- Magen
- Lunge
- Dünndarm
- Dickdarm.

Parallel dazu wurde ein mit Pepstatin behandeltes Tier getötet, entblutet und wie bei den Tieren der Gruppe 0 die Organe entnommen. Diese Tiere bildeten die Gruppe I.

Das zweite mit Penstatin behandelte Tier erhielt vom Zeitpunkt des Todes des Tieres der Gruppe 0 keine weiteren Injektionen mehr und wurde unter aseptischen Bedingungen zur Bestimmung der Überlebenszeiten gehalten. Diese Tiere bildeten die Gruppe II. Beim Tod dieser Tiere wurden in gleicher Weise Organe entnommen.

Diese Organe wurden, wie in Abschnitt 2.1. beschrieben, auf die Aktivitäten der sauren und neutralen Proteinasen hin untersucht.

4.2. Ergebnisse

Zur Untersuchung der Frage, ob durch Penstatin das Verhalten der Proteinasenaktivität zu hemmen ist und zur Verlaufskontrolle bei den zur Bestimmung der Überlebenszeiten gehaltenen Tieren, wurden folgende Gruppenvergleiche statistisch untersucht. Der Vergleich erfolgte mit dem t-Test; als Signifikanzniveau wurde $p < 0,05$ festgelegt.

1) Kontrollgruppe mit Gruppe 0

Es wurde untersucht, ob durch eine experimentell erzeugte Peritonitis eine Änderung im Aktivitätsniveau der sauren und neutralen Proteinasen erfolgte.

2) Gruppe 0 mit Gruppe I

Dieser Vergleich soll zeigen, in welchem Maße die Aktivitäten der sauren und neutralen Proteinasen zum Zeitpunkt des Todes der Tiere der Gruppe 0 durch Pepastatin zu beeinflussen sind.

3) Kontrollgruppe mit Gruppe I

Hier wurde untersucht, ob durch Pepstatin das Ausmaß der Proteinasenwirkung im Vergleich zur Kontrollgruppe ganz zu hemmen ist.

4) Gruppe I mit Gruppe II

Dieser Vergleich zeigt das Verhalten der Proteinasen nach Absetzen der Pepstatintherapie zum Zeitpunkt des Todes der Tiere der Gruppe II, bezogen auf den Status der lebenden Tiere unter Pepstatin. Es sollte auch die Frage eines möglichen Rebound-Effektes geklärt werden.

5) Gruppe O mit Gruppe II

Wenn die Proteinasen durch ihre zerstörerische Wirkung ursächlich den Tod der Tiere herbeiführen, sollten im Vergleich dieser zwei Gruppen keine signifikanten Unterschiede auftreten.

4.2.1. Saure Proteinasen

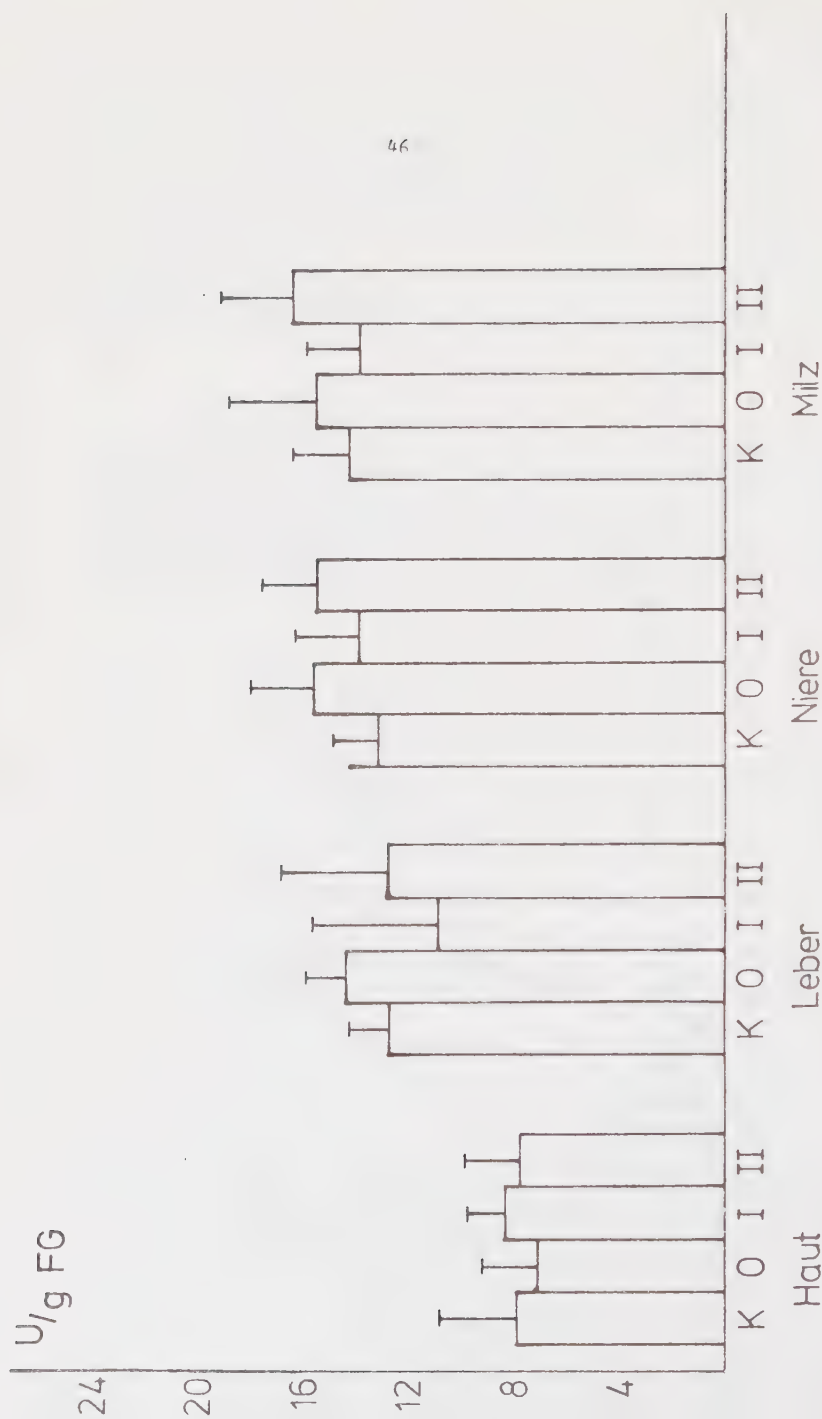
Keine signifikanten Unterschiede, bezogen auf Gramm Frischgewicht, ließen sich bei der Haut im Vergleich der einzelnen Gruppen, wie in 4.2. beschrieben, nachweisen. Bezogen auf mg Protein im Ansatz, waren die Aktivitäten im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant vermindert (Abb. V, VI).

Tabelle V

Experimentell erzeugte Peritonitis

Saure Proteinasen, Aktivität bezogen auf Gramm Frischgewicht (U/g FG)

	Kontrolltiere			Gruppe C			Gruppe I			Gruppe II		
	n	$\bar{x}$	s	n	$\bar{x}$	s	n	$\bar{x}$	s	n	$\bar{x}$	s
Haut	6	7,96	2,85	9	7,14	2,21	9	8,32	1,33	5	7,68	2,02
Leber	6	12,75	1,36	10	14,33	1,70	9	10,84	4,60	6	12,78	3,91
Niere	6	13,17	1,45	10	15,59	2,45	10	13,84	2,31	6	15,56	1,93
Milz	6	14,23	2,01	10	15,49	3,05	10	13,84	2,08	6	16,43	3,02
Magen	6	22,28	0,59	10	22,41	1,93	10	20,89	1,10	6	21,96	2,99
Lunge	6	12,28	0,96	10	12,20	1,71	10	9,69	3,70	6	12,02	2,91
Dünndarm	6	12,39	1,53	9	12,22	2,19	9	9,54	4,21	6	8,02	2,85
Nickdarm	6	12,65	0,52	9	15,25	1,62	9	10,43	6,31	6	9,31	5,61



46

Abbildung V: Experimentelle periphere Peritonitis.

Sagittal Section, Abdominal Cavity of Guinea Pig, 1950.

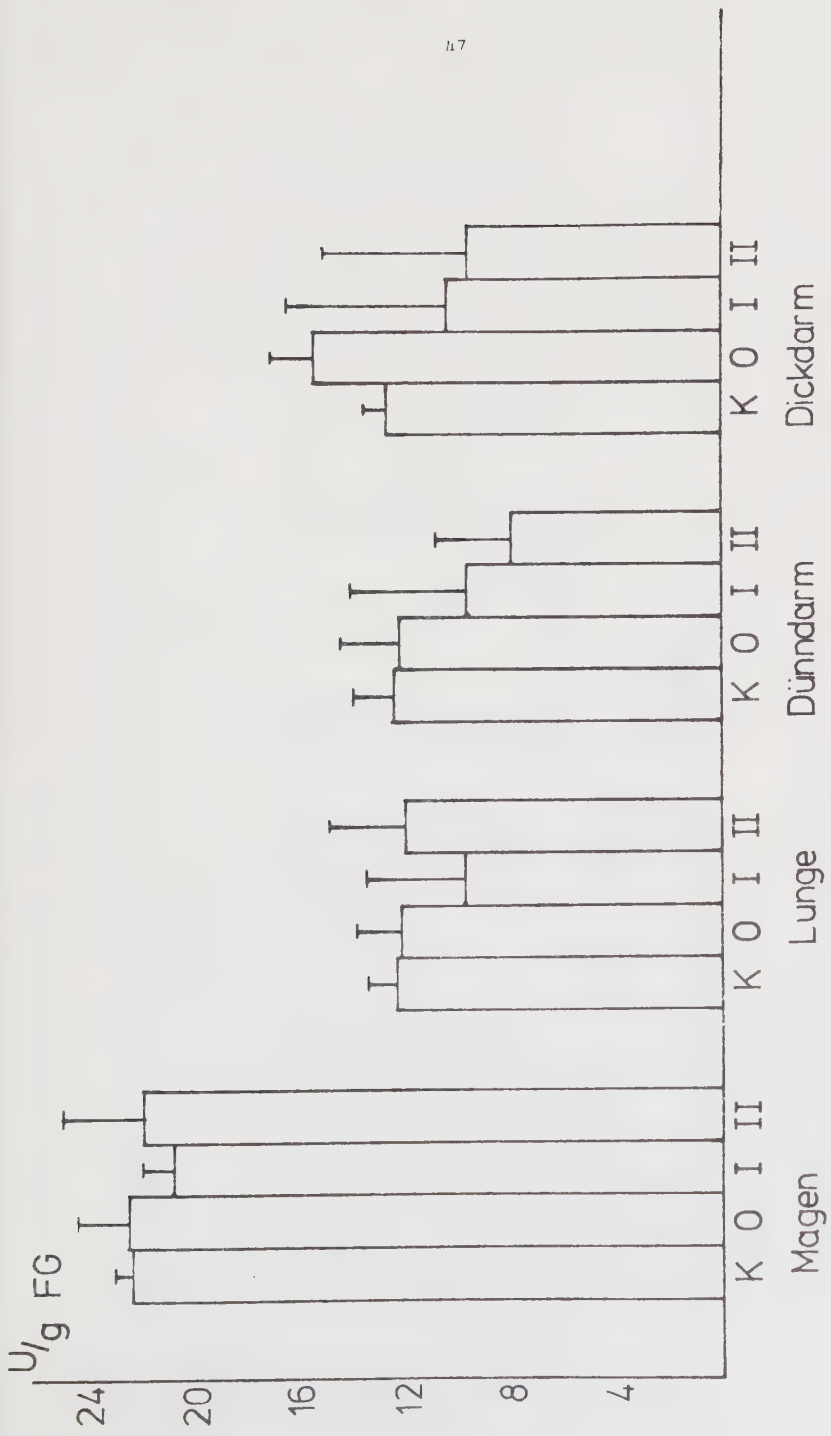


Abbildung V/2: Experimentell erzeugte Peritonitis
 Saure Proteinasen, Aktivität bezogen auf Gramm Frischgewicht (U/g FG)

Tabelle VI

Experimentell erzeugte Peritonitis

Saure Proteinasen, Aktivität bezogen auf mg Protein (IU/mg Protein)

	Kontrolltiere			Gruppe C			Gruppe I			Gruppe II		
	n	$\bar{x}$	s	n	$\bar{x}$	s	n	$\bar{x}$	s	n	$\bar{x}$	s
Haut	6	0,481	0,18	9	0,278	0,18	8	0,252	0,14	5	0,195	0,10
Leber	6	0,121	0,013	10	0,120	0,011	10	0,107	0,035	6	0,108	0,010
Niere	6	0,198	0,05	9	0,211	0,040	10	0,265	0,058	6	0,201	0,029
Milz	6	0,332	0,082	10	0,267	0,073	10	0,207	0,050	6	0,281	0,037
Magen	6	0,630	0,071	10	0,504	0,178	10	0,562	0,191	6	0,453	0,125
Lunge	6	0,246	0,044	10	0,128	0,023	10	0,196	0,132	6	0,127	0,044
Dünndarm	6	0,328	0,082	9	0,234	0,078	9	0,242	0,131	6	0,185	0,131
Dickdarm	6	0,380	0,175	9	0,435	0,157	9	0,274	0,133	6	0,198	0,116

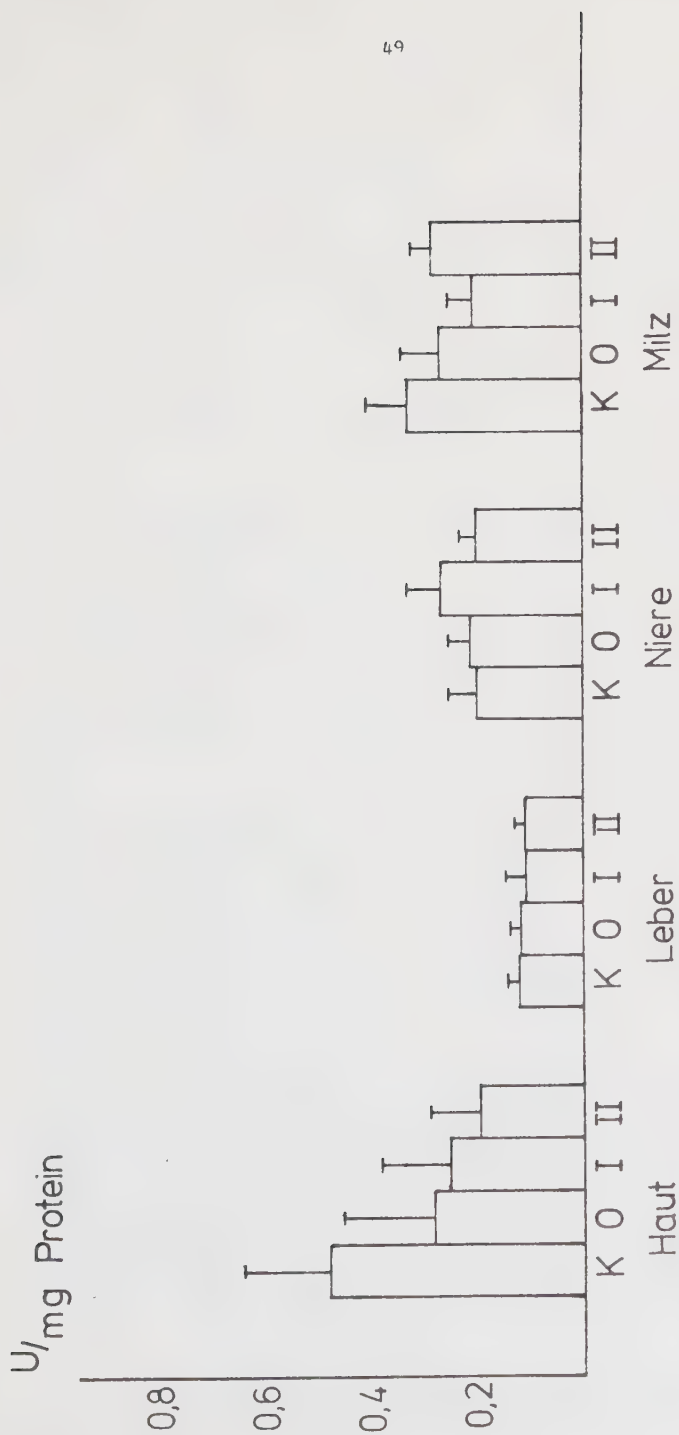


Abbildung VI/1: Experimentell erzeugte Peritonitis
Saure Proteinasen, Aktivität bezogen auf mg Protein (U/mg Protein)

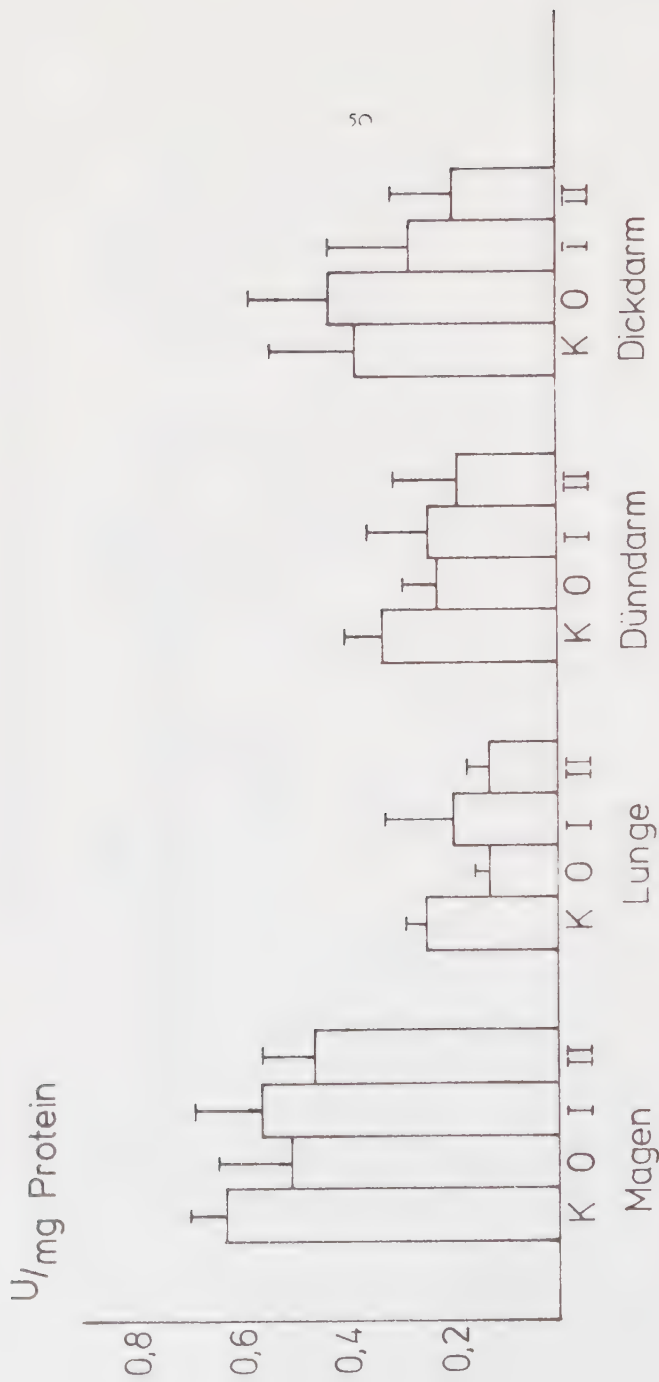


Abbildung VI/2: Experimentell erzeugte Peritonitis
 Saure Proteinase, Aktivität bezogen auf mg Protein (U/mg Protein)

Aktivität bezogen auf Gramm Frischgewicht (tl/g FG)

Gruppen	Haut	Leber	Niere	Milz	Magen	Lunge	Dünndarm	Dickdarm
K : O	> 0,1	< 0,05	< 0,0125	> 0,1	> 0,1	> 0,1	> 0,1	< 0,005
O : I	> 0,1	0,05	> 0,1	> 0,1	< 0,05	> 0,05	> 0,05	< 0,05
K : I	> 0,1	> 0,1	> 0,1	> 0,1	< 0,01	> 0,05	= 0,05	> 0,1
I : II	> 0,1	> 0,1	> 0,1	= 0,05	> 0,1	> 0,1	> 0,1	> 0,1
O : II	> 0,1	> 0,1	> 0,1	> 0,1	> 0,1	> 0,1	< 0,005	< 0,05

Aktivität bezogen auf mg Protein (tl/mg Protein)

Gruppen	Haut	Leber	Niere	Milz	Magen	Lunge	Dünndarm	Dickdarm
K : O	< 0,05	> 0,1	> 0,1	< 0,05	< 0,05	< 0,005	< 0,05	> 0,1
O : I	> 0,1	> 0,1	> 0,1	< 0,05	> 0,1	< 0,05	> 0,1	< 0,05
K : I	< 0,05	> 0,1	< 0,05	< 0,0025	> 0,1	< 0,1	> 0,1	> 0,1
I : II	> 0,1	> 0,1	< 0,025	< 0,001	> 0,1	> 0,1	> 0,1	> 0,1
O : II	> 0,1	> 0,1	> 0,1	> 0,1	> 0,1	> 0,1	> 0,1	< 0,0025

Tabelle VII:

Experimentell erzeugte Peritonitis

Saure Proteinasen, Signifikanzschranken (p-Werte)

Ein gleichsinniges Verhalten, bezogen auf Gramm Frischgewicht, fand sich bei den Aktivitäten der Organe Leber, Niere und Milz. In Gruppe O zeigte sich ein Anstieg der Aktivitäten, gefolgt von einem Abfall in Gruppe I und ein Wiederanstieg in der Gruppe II, immer im Vergleich zur Kontrollgruppe. Bei der Leber war der Anstieg der sauren Proteinasen in der Gruppe O gegenüber der Kontrollgruppe signifikant und die Enzymhemmung durch Pepstatin in der Gruppe I war ebenfalls signifikant. Die spezifische Aktivität, gemessen in Units/mg Protein, war in allen Gruppen ohne nennenswerte Unterschiede. Ein ähnliches Verhalten zeigte der Aktivitätsverlauf bei der Niere. Der Anstieg der sauren Proteinasen in der Gruppe O im Vergleich zu den Kontrolltieren war signifikant. Die anderen Aktivitäten bei der Niere, bezogen auf Gramm Frischgewicht, zeigten keine signifikanten Unterschiede. Die spezifische Aktivität war bei der Gruppe I am höchsten; die anderen Gruppen zeigten niedrigeres Aktivitätsniveau. Die statistische Auswertung ergab eine signifikante Erhöhung der Gruppe I im Vergleich zur Kontrollgruppe und zur Gruppe II. Bei der Milz war der Anstieg im Aktivitätsniveau der sauren Proteinasen der Gruppe II, also nach Absetzen der Pepstatintherapie, im Vergleich zur Gruppe I, signifikant.

Größere Unterschiede zeigten sich bei der spezifischen Aktivität. Die höchste Aktivität, bezogen auf mg Protein im Ansatz, zeigten dabei die Kontrolltiere. Die Hemmung durch Pepstatin in der Gruppe I war signifikant nachweisbar im Vergleich zu den Gruppe O, II und der Kontrollgruppe. Auch der Abfall der spezifischen Aktivität der Gruppe O gegenüber den Kontrolltieren war signifikant. Die inhibitorische Wirkung des Pepstatins in der Gruppe I ließ sich am Magen nachweisen. Im Vergleich zur Kontrollgruppe und zur Gruppe O waren die Unterschiede signifikant. Bei der spezifischen Aktivität zeigte sich ein Abfall in Gruppen O und II, also zum Zeitpunkt des Todes der jeweiligen Tiere, der bei der Gruppe O im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikant war.

Auch beim Organ Lunge war die Hemmwirkung des Penstatins in der Gruppe I deutlich. Die Unterschiede waren im Vergleich zu den Kontrolltieren und der Gruppe O signifikant. Bei der spezifischen Aktivität ergaben sich Parallelen zum Magen. Die höchsten Aktivitäten zeigten die Kontrolltiere und die Gruppe I. Bei fortgeschrittener Wirkung der Proteinasen in den Gruppen O und II fiel die spezifische Aktivität ab; die Unterschiede waren signifikant. Am Dünndarm und Dickdarm war die inhibitorische Wirkung des Pepstatins

in den Gruppen I und II sichtbar und signifikant. Hier kam es nach Absetzen der Pepstatintherapie nicht wieder zu einem Anstieg der sauren Proteinase. Dieses Verhalten wiederholte sich bei der Bestimmung der spezifischen Aktivität. Die höchsten Anstiege im Aktivitätsniveau der sauren Proteinase fanden sich beim Dickdarm in der Gruppe O, sowohl bezogen auf Gramm Frischgewicht wie auch auf mg Protein. Der Dünndarm dagegen zeigte diesen Anstieg nicht.

4.2.2. Neutrale Proteinase

Bei der Haut fiel der Anstieg der neutralen Proteinase in der Gruppe I gegenüber den anderen drei Gruppen auf. Alle diese Unterschiede waren signifikant. Auch bei der Bestimmung der spezifischen Aktivität fiel das hohe Niveau der Tiere der Gruppe I sowie das der Kontrolltiere auf. Die Unterschiede im Vergleich zu den Gruppen O und II waren signifikant. Geringe Unterschiede in der Aktivität, bezogen auf Gramm Frischgewicht, waren bei der Leber zu finden. Ein anderes Bild zeigte sich beim Vergleich der spezifischen Aktivitäten der einzelnen Gruppen. Das höchste Niveau war hier bei der Gruppe I. Die Unterschiede zu den niedrigeren Aktivitäten der anderen drei Gruppen waren signifikant.

Bei der Niere imponierte der deutliche Abfall der Enzymaktivität in der Gruppe II. Die anderen Gruppen zeigten dagegen keine nennenswerten Unterschiede untereinander. Bei der Bestimmung der Aktivität, bezogen auf mg Protein, fiel der Gipfel im Aktivitätsniveau bei der Gruppe I auf. Die Unterschiede zu den anderen Gruppen waren signifikant. Deutlich war auch der Abfall der Aktivität bei der Gruppe II im Vergleich zu den Gruppen O und I.

Bei der Milz war ebenfalls der schon mehrfach beobachtete Anstieg der Aktivität der neutralen Proteinase der Gruppe I im Vergleich zu den Gruppen O und II zu sehen. Signifikant war der Anstieg aber nur gegenüber der Gruppe II. Beim Vergleich der gemessenen Aktivitäten, bezogen auf mg Protein, fällt bei der Milz das niedrige Niveau bei den mit E. coli infizierten Tieren im Gegensatz zur Kontrollgruppe auf. Die Unterschiede der Gruppen O, I und II untereinander waren nicht signifikant.

Beim Magen wurde ein Anstieg der neutralen Proteinase in der Gruppe O im Vergleich zur Kontrollgruppe gemessen. Die Hemmwirkung des Pepstatins

Kontrolltiere				Gruppe C			Gruppe I			Gruppe II		
	n	$\bar{x}$	s	n	$\bar{x}$	s	n	$\bar{x}$	s	n	$\bar{x}$	s
Haut	6	0,760	0,15	9	0,74	0,31	9	1,21	0,37	6	0,73	0,60
Leber	6	6,07	0,96	10	6,69	1,20	10	6,61	1,83	6	6,07	1,29
Niere	6	3,01	0,87	10	2,93	0,64	10	2,99	1,01	6	2,31	0,42
Milz	6	4,98	0,52	10	4,20	1,63	10	4,74	1,65	6	3,42	1,45
Magen	6	1,03	0,23	10	1,94	0,96	10	1,37	1,37	6	1,44	0,81
Lunge	6	3,60	0,15	10	3,26	0,94	10	3,19	1,29	6	2,04	0,45
Dünndarm	6	2,24	0,27	9	2,44	0,85	10	2,66	1,20	6	0,98	0,13
Dickdarm	6	3,18	0,35	9	2,55	1,48	9	3,37	1,51	6	1,41	0,57

Tabelle VIII:
Experimentell erzeugte Peritonitis
Neutrale Proteinase, Aktivität bezogen auf Gramm Frischgewicht (11/g FG)

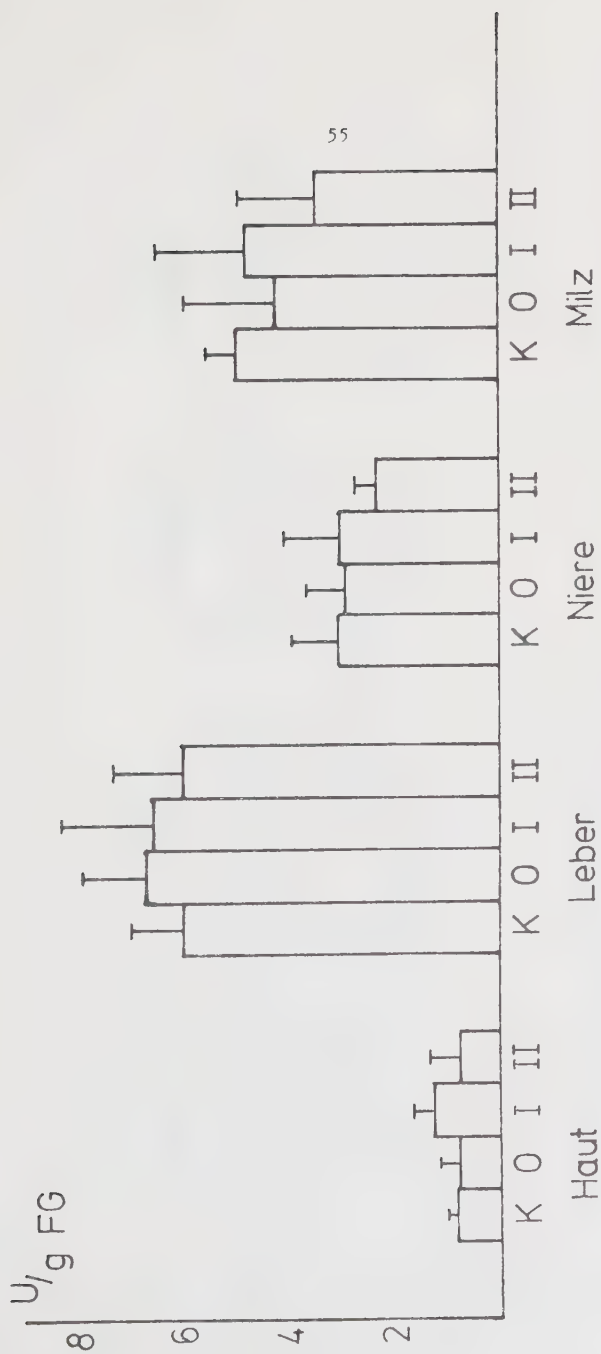


Abbildung VIII/1: Experimentell erzeugte Peritonitis

Neutrale Proteinasen, Aktivität bezogen auf Gramm Frischgewicht (U/g FG)

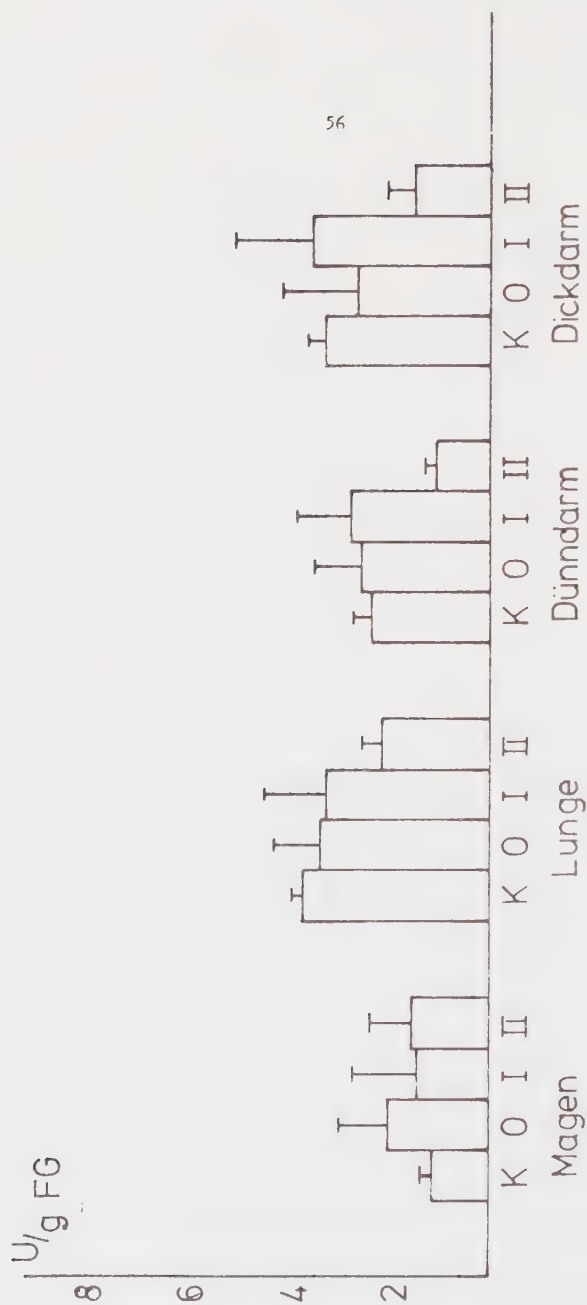


Abbildung VIII/2: Experimentell erzeugte Peritonitis

Neutrale Proteinase, Aktivität bezogen auf Gramm Frischgewicht (U/g FG)

	Kontrolltiere			Gruppe C			Gruppe I			Gruppe II		
	n	$\bar{x}$	s	n	$\bar{x}$	s	n	$\bar{x}$	s	n	$\bar{x}$	s
Haut	6	0,046	0,014	9	0,026	0,015	9	0,036	0,015	6	0,016	0,015
Leber	6	0,057	0,007	9	0,056	0,013	10	0,066	0,007	6	0,054	0,010
Niere	6	0,039	0,007	10	0,046	0,018	10	0,064	0,018	6	0,030	0,004
Milz	6	0,116	0,020	10	0,071	0,029	10	0,057	0,025	6	0,059	0,030
Magen	6	0,028	0,004	10	0,042	0,021	10	0,020	0,023	6	0,025	0,010
Lunge	6	0,072	0,010	10	0,035	0,014	10	0,045	0,027	6	0,022	0,006
Dünndarm	6	0,063	0,020	9	0,045	0,019	9	0,055	0,034	6	0,020	0,007
Dickdarm	6	0,093	0,032	9	0,064	0,026	9	0,079	0,038	6	0,032	0,016

Tabelle IX: Experimentell erzeugte Peritonitis
Neutrale Proteinase, Aktivität bezogen auf mg Protein (U/mg Protein)

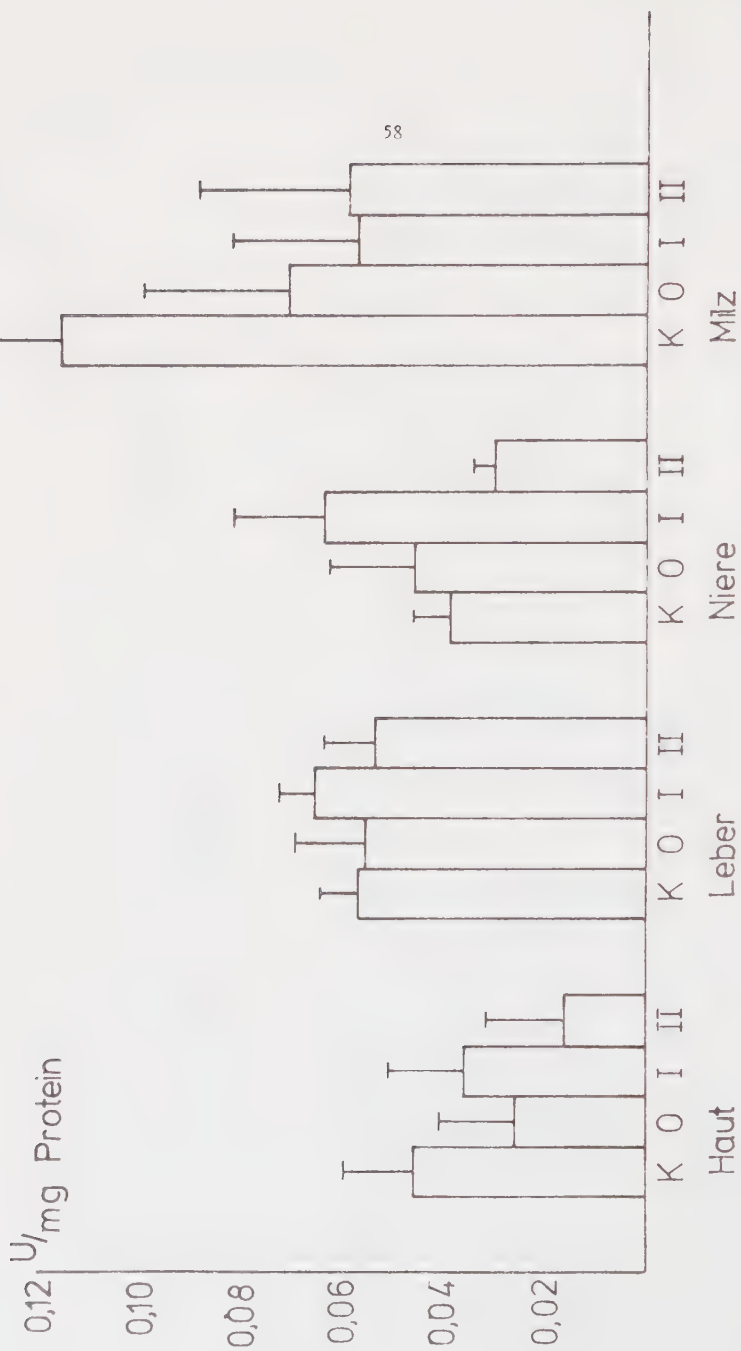


Abbildung IX/1: Experimentell erzeugte Peritonitis.

Neutrale Proteinasen, Aktivität bezogen auf mg Protein / U/mg Protein)

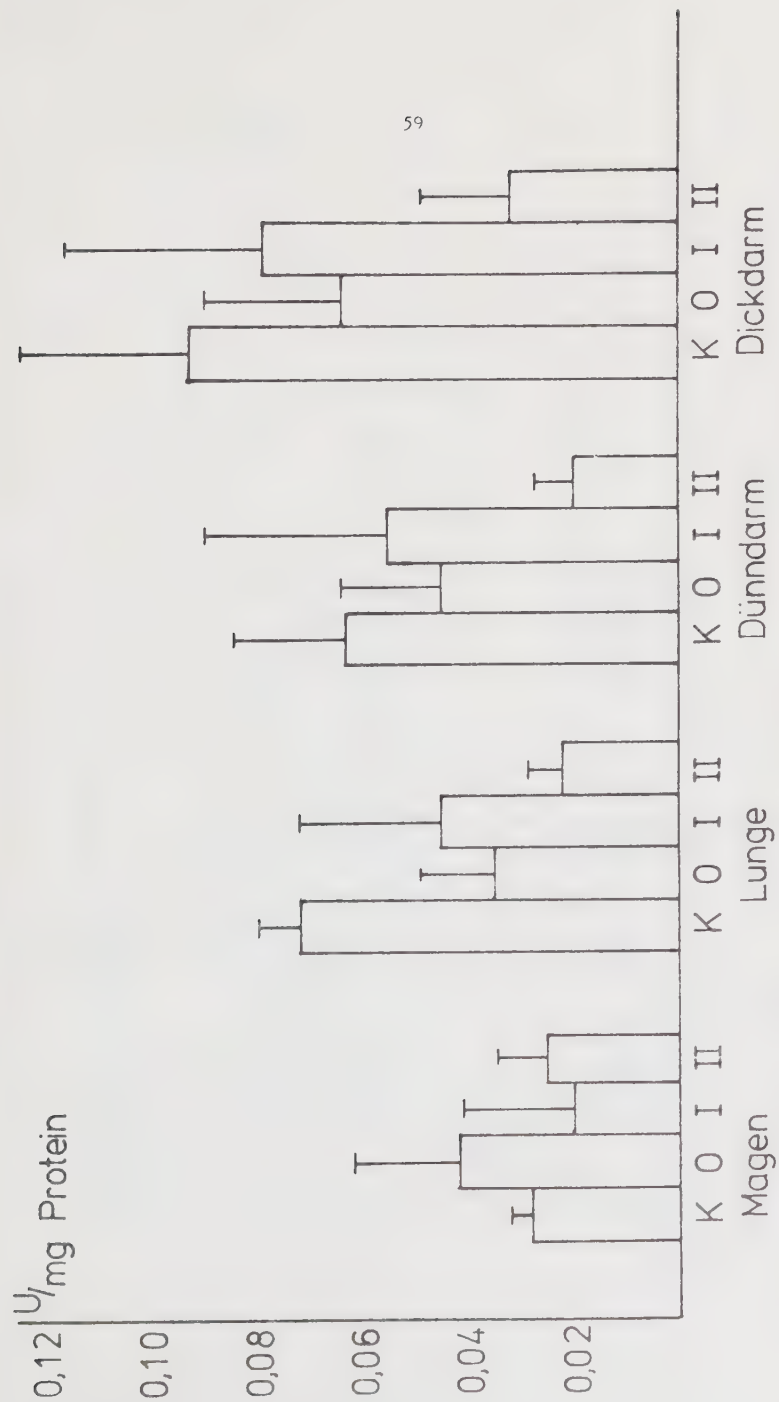


Abbildung 1X/2: Experimentell erzeugte Peritonitis

Neutrale Proteinasen, Aktivität bezogen auf mg Protein (U/mg Protein)

Aktivität bezogen auf Gramm Frischgewicht (U/g FG)

Gruppen	Haut	Leber	Niere	Milz	Magen	Lunge	Dünndarm	Dickdarm
K : O	> 0,1	> 0,1	> 0,1	> 0,1	< 0,0025	> 0,1	> 0,1	> 0,1
O : I	< 0,025	> 0,1	> 0,1	> 0,1	> 0,1	> 0,1	> 0,1	> 0,1
K : I	< 0,005	> 0,1	> 0,1	> 0,1	> 0,1	> 0,1	> 0,1	> 0,1
I : II	< 0,05	> 0,1	< 0,05	< 0,05	> 0,1	< 0,05	< 0,005	< 0,0125
O : II	> 0,1	> 0,1	< 0,05	> 0,1	> 0,1	< 0,0025	< 0,005	< 0,05

Aktivität bezogen auf mg Protein (U/mg Protein)

Gruppen	Haut	Leber	Niere	Milz	Magen	Lunge	Dünndarm	Dickdarm
K : O	< 0,05	< 0,05	> 0,1	< 0,0025	< 0,0125	< 0,005	> 0,1	< 0,05
O : I	> 0,05	< 0,05	> 0,05	> 0,1	< 0,05	> 0,1	> 0,1	> 0,1
K : I	> 0,1	< 0,025	< 0,01	< 0,0025	> 0,1	< 0,025	> 0,1	> 0,1
I : II	< 0,025	< 0,005	< 0,01	> 0,1	> 0,1	< 0,05	< 0,025	< 0,005
O : II	> 0,1	> 0,1	< 0,025	> 0,1	≈ 0,05	< 0,05	< 0,005	< 0,01

Tabelle X:

Experimentell erzeugte Peritonitis

Neutrale Proteinasen, Signifikanzschranken (p-Werte)

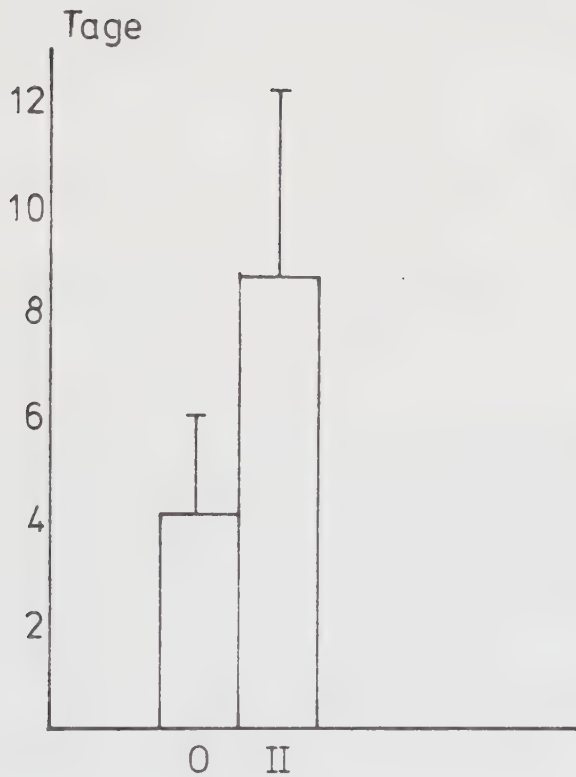


Abbildung XI: Experimentell erzeugte Peritonitis
Darstellung der Lebenszeiten der Gruppen O und II

auf neutrale Proteinase zeigte sich im Abfall der Aktivität der Gruppen I und II fast bis auf die Werte der Kontrollgruppe. Dieses Verhalten konnte auch bei der Bestimmung der spezifischen Aktivität, bezogen auf mg Protein, nachgewiesen werden. Der Abfall der Aktivität in den Gruppen I und II war gegenüber der Gruppe 0 signifikant.

Ein anderes Verhalten zeigten die Aktivitätsverläufe in der Lunge. Es kam zu einem leichten Abfall in den Gruppen 0 und I gegenüber den Kontrolltieren; in der Gruppe II war ein signifikanter Abfall im Vergleich zu den Gruppen 0 und I zu messen. Ein ähnliches Verhalten der Gruppen zeigte sich bei der Bestimmung der spezifischen Aktivität. Der Abfall der Gruppe II war im Vergleich zu den anderen infizierten Tieren signifikant. Insgesamt waren bei allen infizierten Tieren der Gruppe 0, I und II die spezifischen Aktivitäten vermindert.

Der Dünndarm wies eine andere Reaktion auf die Injektion von *E. coli* auf. Eine drastisch erniedrigte Aktivität zeigten die verstorbenen Tiere der Gruppe II. Die Unterschiede zu den anderen Gruppen waren hochsignifikant (Tab. X). Die Aktivitäten der anderen drei Gruppen unterschieden sich nur wenig voneinander. Der Abfall der Aktivität der neutralen Proteinase in der Gruppe II zeigte sich auch bei der spezifischen Aktivität; die gemessenen Aktivitäten waren signifikant vermindert.

Auch beim Dickdarm ließ sich der Aktivitätsverlauf der neutralen Proteinase in ähnlicher Form nachweisen. Der deutliche Abfall in den gemessenen Aktivitäten der Gruppe II, sowohl bezogen auf Gramm Frischgewicht wie auch auf mg Protein, war im Vergleich zu den Gruppen 0 und I signifikant. Ebenso war die verminderte Aktivität der Gruppe 0 im Vergleich mit den Kontrolltieren signifikant.

4.2.3. Lebenszeiten

Tage						
Gruppe O			Gruppe II			
n	$\bar{x}$	s	n	$\bar{x}$	s	p
9	4,111	1,833	6	8,333	3,612	0,01

Tabelle XI

Darstellung der Lebenszeiten der Tiere der Gruppen O und II

Bei den Versuchen zur Erzeugung einer Peritonitis als Modell eines septischen Schocks beim Meerschweinchen wurden Tiere, die der Gruppe II zugeordnet waren, mit Pepstatin und einer Suspension von *E. coli* behandelt. Nach dem Tod der Tiere der Gruppe O, die kein Pepstatin, sondern nur eine *E. coli*-Suspension erhielten, wurden den Tieren der Gruppe II keine weiteren Injektionen mehr verabreicht. Sie wurden unter aseptischen Bedingungen zur Bestimmung der Lebenszeiten gehalten. Die pathologischen Veränderungen durch die experimentell erzeugte Peritonitis waren bei allen Tieren der Gruppe II bereits soweit fortgeschritten, daß kein Tier überlebte. Es starb jedoch in keinem Fall ein mit Pepstatin behandeltes Tier (Gruppen I und II) vor einem Tier der Gruppe O (keine Pepstatin-Injektionen). Die Lebenszeiten der mit Pepstatin behandelten Tiere betrugen im Mittel 8,333 Tage gegenüber nur 4,111 Tagen bei den nicht mit Pepstatin behandelten Tieren. Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen war signifikant.

4.3. Diskussion

Anhand der experimentell erzeugten Peritonitis als Modell eines septischen Schocks beim Meerschweinchen solltendie Veränderungen der Aktivitäten der sauren und neutralen Proteinase in verschiedenen Geweben dargestellt werden. Gleichzeitig sollte geprüft werden, ob die inhibitorische Wirkung von Pepstatin in einer Verminderung des Aktivitätsniveaus in der Gruppe

I nachgewiesen werden kann. Die Untersuchungen erfolgte in zwei pH-Bereichen: im sauren Bereich bei pH 3,2 und im neutralen Bereich bei pH 7,6.

Als klinischer Parameter für die Wirksamkeit einer Therapie mit einem Proteinaseinhibitor, hier des Pepstatins, beim septischen Schock wurden die Lebenszeiten der Tiere mit und ohne Pepstatin miteinander verglichen. Auch wurde untersucht, ob es nach Absetzen der Pepstatin-Therapie zu einem Wiederanstieg der Enzymaktivität kam (Gruppe II).

Die Bestimmung saurer Proteinase ist an die Bestimmung von Kathepsin D adaptiert; beim Magen sind Interferenzen mit dem Magenferment Pepsin nicht auszuschließen.

Im neutralen Bereich gibt es keine eindeutige Substratspezifität für ein Enzym; eine Schlüsselstellung nimmt sicher die Elastase ein (45, 71). Bei der beschriebenen Versuchsanordnung mit Hämoglobin als Substrat wurde dabei die Gesamtheit der neutralen Proteinase gemessen.

Die Verlängerung der Lebenszeiten der mit Pepstatin behandelten Tiere als klinischer Parameter für die Wirksamkeit einer Pepstatin-Therapie beim septischen Schock war signifikant. Es zeigte die zentrale Rolle der freigesetzten Proteinase beim septischen Schock und die Wirksamkeit der logischen Therapie mit Inhibitoren im beschriebenen Versuch mit Pepstatin. Es kamen keine weiteren, heute allgemein gültigen Therapieformen zur Anwendung.

Diese klinisch sichtbare Wirkung des Penstatins läßt sich auch durch Aktivitätsbestimmungen in den einzelnen Organen nachweisen. Bei den Organen, die am Schockgeschehen bei einer durch Peritonitis ausgelösten Sepsis beteiligt sind, war ein signifikanter Abfall der Aktivitäten im Vergleich der Gruppen O und I nachweisbar. Die Organe Leber, Niere, Milz und Magen (mit den erwähnten Einschränkungen), Lunge, Dünndarm und Dickdarm zeigen alle einen deutlichen signifikanten Abfall im Aktivitätsniveau der Gruppe I, die mit einer Suspension von E. coli und Pepstatin behandelt wurde, im Vergleich zur Gruppe O, die nur mit E. coli infiziert wurde (Abb. 1/1,2). Bei den zentralen Schockorganen Leber, Niere, Milz und Lunge fand sich bei den Tieren der Gruppe II, also nach Absetzen der Pepstatin-Therapie, zum Zeitpunkt des Todes dieser Tiere ein signifikanter Wiederanstieg der Aktivitäten der sauren Proteinase, meist wieder bis auf das Niveau der Tiere der Gruppe O. Die Tiere der Gruppen O und II starben spontan; die Organe wurden unmittelbar post mortem entnommen. Dieses Verhalten ist sicher als Hinweis auf die zerstörerische Aktivität freigesetzter saurer

Proteinasen zu interpretieren, wobei durch die massive Freisetzung die körpereigenen Inhibitorsysteme überfordert wurden. Eine zentrale Stellung nehmen hier die aus Phagozyten freigesetzten Enzyme ein, im sauren Bereich ist das Kathepsin D vorherrschend. Phagozyten werden durch Infektion und Weichteilzerstörung stimuliert.

Die beiden untersuchten Darmabschnitte, als primäres Zielorgan einer Peritonitis durch *E. coli*, zeigen ein etwas anderes Verhalten als die eigentlichen Schockorgane. Auch hier ist, wie bereits erwähnt, die Hemmwirkung des Pepstatins auf saure Proteinase biochemisch nachweisbar. Aber nach Absetzen der Pepstatin-Therapie bei den Tieren der Gruppe II läßt sich kein Wiederanstieg der Enzymaktivität im Sinne eines Rebound-Phänomens belegen; es kommt im Gegenteil zu einem weiteren Abfall der Aktivität der sauren Proteinase bis zum Tode dieser Tiere. Bezieht man die gemessenen Aktivitäten auf die Menge Protein im Ansatz, bezeichnet als spezifische Aktivität (U/mg Protein), so läßt sich dieser Abfall bei beiden Darmabschnitten noch deutlicher darstellen (Abb. VI/2). Dieses Verhalten ist als Ausdruck einer Zerstörung des Organs zu werten. Bei der Leber zeigen sich, gemessen in U/mg Protein, keine Unterschiede in allen Gruppen, die über eine normale Streuung hinausgehen, jedoch einige deutliche Unterschiede, bezogen auf Gramm Frischgewicht.

Dies ist Ausdruck einer erhöhten Syntheserate der Leber.

Auch bei der Haut, als eigentlich nicht betroffenes Organ, lassen sich signifikante Veränderungen nachweisen. Die hemmende Wirkung des Pepstatins kommt hier zwar nicht zum Tragen, aber durch die Injektion von *E. coli* und Pepstatin resultiert ein deutlich geändertes Enzymmuster (Abb. VI/1). Dies zeigt eindrucksvoll, daß beim Schockgeschehen der Organismus als Gesamtheit reagiert und kein Organsystem ausgespart bleibt. Möglicherweise wirken bei der Haut noch die körpereigenen Inhibitorsysteme, während es bei den Organen Leber, Niere, Milz, Lunge und Dickdarm zu einem Versagen dieser eigenen Inhibitoren kommt. Die freigesetzten Enzyme wirken nicht nur auf bestimmte Proteine, sondern auch ganz unspezifisch durch Abbau vieler Proteine, z.B. Transportproteine, Immunglobuline und auch Inhibitorproteine. Diese Überforderung der endogenen Inhibitorsysteme läßt sich, was bei den sauren Proteinase nachgewiesen werden konnte, durch Pepstatin therapeutisch angehen.

Im neutralen Bereich ist, wie in Abschnitt 3.2.3. dargestellt wurde, keine so eindeutige Dominanz eines einzelnen Enzyms mit Hämoglobin als Substrat,

vorhanden. In den letzten Jahren ist die Elastase in den Mittelpunkt von Interesse gerückt, wie in Arbeiten von JOCHUM und Mitarbeitern dargestellt werden konnte (43, 44, 45).

Wie komplex das Geschehen einer Sepsis ist, verdeutlicht auch im neutralen Bereich das Beispiel der Haut, deren Enzymmuster, bezogen auf mg Protein, durch einen signifikanten Abfall der Enzymaktivitäten bei den gestorbenen Tieren der Gruppen O und II verändert wird. Das Organ "Haut" wurde bisher bei Untersuchungen über Veränderungen im Verlauf eines Schockgeschehens (Ausnahme: Verbrennungsschock) außer acht gelassen. Die inhibitorische Wirkung des Pepstatins ist im neutralen Bereich nicht so deutlich wie im sauren pH-Bereich nachweisbar; eine verminderte Aktivität der Gruppe I im Vergleich zur Gruppe O fand sich nur beim Magen und, bezogen auf mg Protein im Ansatz, bei Milz und Magen. Bei der Milz ist das sicherlich Ausdruck eines großen Granulozytenpools. Bei allen Organen fehlt auch im neutralen pH-Bereich bei der Gruppe II der Wiederanstieg im Sinne eines Rebound-Phänomens nach Absetzen der Pepstatin-Therapie. Bei der Gruppe II fällt im Gegenteil auf, daß bei allen untersuchten Organen, mit Ausnahme des Magens, die Aktivität der neutralen Proteinasen drastisch und signifikant vermindert ist im Vergleich zu den Gruppen O und I. Bei den den letalen Ausgang beeinflussenden Organen Niere, Lunge, Dünndarm und Dickdarm ist auch ein Abfall der spezifischen Aktivitäten der Gruppe O zu sehen. Bei all den genannten Organen ist in der Gruppe II die Aktivität der neutralen Proteinasen, bezogen auf mg Protein, noch weiter deutlich unter den Wert der Kontrolltiere vermindert. Dieser Abfall der Enzymaktivität der neutralen Proteinasen ist als eine mögliche Ursache für den Tod dieser Tiere anzusehen. Es scheint jedoch, daß der Verlauf der Aktivität der neutralen Proteinasen, speziell der Elastase, als ein möglicher Parameter für das Ausmaß der Sepsis und damit der Organveränderungen anzusehen ist. Arbeiten von JOCHUM und Mitarbeitern zeigen ebenfalls in diese Richtung (44, 45).

Bei den Untersuchungen wurden Auswirkungen der Peritonitis auf das kardiovaskuläre System und den Gasaustausch außer acht gelassen. Insgesamt scheinen die Veränderungen der Aktivitäten, besonders an den Organen Lunge, Niere, Milz und Darm doch den Schluß zuzulassen, daß durch den Einsatz von Proteinaseinhibitoren, hier des Pepstatins, ein logischer therapeutischer Ansatz zum Durchbrechen des Circulus vitiosus beim Schockgeschehen gegeben ist. Dabei zeigt sich Pepstatin als potenter Inhibitor der sauren Proteinasen,

aber die Verlängerung der Lebenszeiten lassen auch eine Wirkung im neutralen Bereich vermuten, z.B. Hemmung der Aktivierung von neutralen Proteinasen durch Kathepsin D. Betrachtet man die Gesamtheit der erhobenen Befunde, so findet man Hinweise auf die zentrale Stellung von körpereigenen Proteinasen sowohl im sauren wie auch im (physiologischen) neutralen pH-Bereich beim Schockgeschehen und eine deutliche Wirkung des Proteinaseninhibitors Pepstatin, wenn es im Schock zu einem Versagen der körpereigenen Inhibitorsysteme kommt. Von großer Bedeutung ist jedoch der Verlauf der neutralen Proteinasen auf den letalen Ausgang eines septischen Schocks. Diese Ergebnisse zeigen sich auch in Arbeiten von DUSWALD, FRITZ, JOCHUM und WITTE (23, 29, 43, 44, 45, 102).

KAY und Mitarbeitern (47) ist die Isolierung eines wasserlöslichen Derivats des Pepstatins gelungen. Die inhibitorische Potenz dieses Lactoyl-Pepstatins auf Kathepsin D ist zwar etwas geringer als die von Pepstatin A, aber durch die bessere Wasserlöslichkeit wird dies durch die jetzt mögliche Dosiserhöhung wieder ausgeglichen.

5. Zusammenfassung

Nach einem Abriß der Proteinaseforschung wird die Nomenklatur und die Terminologie der Proteinase erläutert sowie ein Überblick über die Katalasen und die neutralen Proteinase gegeben. Eine kurze Darstellung erläutert den pathophysiologischen Ablauf beim Schockgeschehen.

In eigenen Untersuchungen wurden nach einer Methode von WEBER (97) die Veränderungen in der Proteinaseaktivität verschiedener Gewebe im sauren und neutralen pH-Bereich untersucht. Dazu wurden den Versuchstieren drittgradige Verbrennungen, die standardisiert 15 % der Körperoberfläche betrugten, beigelegt. Diese Verbrennungen wurden durch Kontamination mit 90 Grad C heißem Wasser für die Dauer von 15 Sekunden hervorgerufen. Am ersten, dritten und fünften Tag erfolgte die Entnahme folgender Organe: Haut, Nekrose, Leber, Niere, Milz, Magen, Lunge und Muskel. Zwischen den einzelnen Entnahmetagen bestanden bei fast allen Organen nur geringe Unterschiede im Aktivitätsniveau. Sie wurden daher in ihrer Gesamtheit mit den Kontrolltieren verglichen. Es wurden folgende Befunde erhoben:

Saure Proteinase:

- 1) Im Vergleich zu den Kontrolltieren kam es bei Niere, Milz, Magen und Lunge zu einem Aktivitätsanstieg, bezogen auf Gramm Frischgewicht. Bei der Haut und bei der Leber kam es zu einer Verminderung der Aktivität.
- 2) Bezogen auf mg Protein zeigten Niere, Milz, Magen und Lunge einen Anstieg der Aktivität; bei Haut und Leber kam es wiederum zu einer Verminderung.
- 3) Bei der Milz fand sich am ersten Tag nach der Verbrühung ein hochsignifikanter Anstieg der Proteinaseaktivität, bezogen auf Gramm Frischgewicht.

Neutrale Proteinase:

- 1) Bezogen auf Gramm Frischgewicht fand sich bei der Haut, Leber, Niere, Milz, Magen und Lunge ein Anstieg der Aktivität, der bei Leber und Milz signifikant war. Im Vergleich der Nekrose mit der Haut der Kontrolltiere und der "gesunden" Haut der verbrühten Tiere ließ sich für die Nekrose ein signifikanter Abfall nachweisen.
- 2) Bei der Bestimmung der spezifischen Aktivität fand sich bei Leber, Niere, Milz, Magen und Lunge ein Anstieg der Enzymaktivität, bei Haut und Nekrose kam es zu einer Verminderung.
- 3) Beim Vergleich der einzelnen Tage zeigte sich bei der Lunge am ersten

Tag nach der Verbrühung ein hochsignifikanter Anstieg der neutralen Proteinaseaktivität, der die bedeutende Rolle dieses Organs beim Schockgeschehen herausstellt.

Insgesamt kommt es bei einer drittgradigen Verbrennung, die 15 % der Körperoberfläche umfaßt, zu einer komplexen Schädigung des gesamten Organismus, die unterschiedliche Änderungen der proteolytischen Aktivität in den einzelnen Organen hervorruft. Lediglich in der Muskulatur ließen sich weder im sauren noch im neutralen Bereich nennenswerte Unterschiede messen.

Es wurde außerdem die Wirkung des Proteinaseinhibitors Pepstatin bei experimentell erzeugter Peritonitis und nachfolgendem septischen Schock als Modell für einen therapeutischen Ansatz eines Proteinaseinhibitors untersucht. Nach einer Einführung in die pathophysiologischen Besonderheiten bei einem septischen Schock werden die chemischen und physikalischen Eigenschaften des Pepstatins beschrieben. Als Modell eines septischen Schocks wurde eine experimentell erzeugte Peritonitis hervorgerufen durch intraperitoneale Injektion einer Suspension von *E. coli*. Gleichzeitig wurde zum Vergleich zwei weiteren Tieren *E. coli* und Pepstatin intraperitoneal injiziert. Beim Tod der nicht mit Pepstatin behandelten Tiere (Gruppe O) wurde ein mit Pepstatin behandeltes Tier getötet und Organe entnommen (Gruppe I). Das zweite, mit Pepstatin behandelte Tier wurde zur Bestimmung der Lebenszeit unter aseptischen Bedingungen gehalten (Gruppe II). Entnommen wurden folgende Organe: Haut, Leber, Niere, Milz, Magen, Lunge, Dünndarm und Dickdarm. Bei diesen Organen wurden die Aktivitäten der sauren und neutralen Proteinase wie beim Verbrühungsschock bestimmt.

Es wurden folgende Befunde erhoben:

Saure Proteinase:

- 1) Durch die Sepsis ohne Behandlung mit Pepstatin fand sich beim Tod der Tiere der Gruppe O eine Erhöhung der Aktivität, bezogen auf Gramm Frischgewicht, bei Leber, Niere, Milz und Dickdarm. Keine nennenswerte Veränderung fand sich bei Magen, Lunge und Dünndarm; ein Abfall bei der Haut.
- 2) Bezogen auf mg Protein in der Enzymlösung ließ sich eine Steigerung der Aktivität nur beim Dickdarm nachweisen. Leber und Niere zeigten keine Veränderung; bei Haut, Milz, Magen, Lunge und Dünndarm wurde eine Verminderung gefunden.
- 3) Bei der Bestimmung der inhibitorischen Wirkung des Pepstatins ließ sich

eine Verminderung der Aktivität der sauren Proteinasen (Gruppe I) bei folgenden Organen, bezogen auf Gramm Frischgewicht, nachweisen: Leber, Niere, Milz, Magen, Lunge, Dünndarm und Dickdarm. Dies bedeutet, daß das intraperitoneal injizierte Pepstatin resorbiert wurde und seine Wirkung im gesamten Organismus, mit Ausnahme der Haut, entfalten konnte.

4) Als Inhibitor war Pepstatin, bezogen auf mg Protein, nur in der Lunge und am Dickdarm wirksam. Bei den anderen Organen kam es teilweise zu einer Erhöhung der spezifischen Aktivität.

5) Betrachtet man die gemessenen Aktivitäten der Gruppe II, gemessen in U/g Frischgewicht, beim Tode dieser Tiere, so fand sich ein Wiederanstieg der sauren Proteinaseaktivität bei Leber, Niere, Milz, Magen und Lunge. Bei den beiden untersuchten Darmabschnitten war dagegen ein weiterer Abfall der Aktivität meßbar.

6) Bezogen auf mg Protein ließ sich eine Erhöhung der Aktivität gegenüber der Gruppe I nur bei der Milz nachweisen. Eine weitere Verminderung erfuhren Haut, Magen, Lunge, Dünn- und Dickdarm.

Neutrale Proteinasen:

1) Bezogen auf Gramm Frischgewicht war durch die Sepsis in der Gruppe O die Aktivität der neutralen Proteinasen bei Leber, Magen und Dünndarm erhöht, unverändert bei der Haut und vermindert bei Niere, Milz, Lunge und Dickdarm, immer im Vergleich zu den Kontrolltieren.

2) Bezogen auf mg Protein fand sich eine Erhöhung in der Gruppe O bei Niere und Magen; eine Verminderung bei Haut, Milz, Lunge, Dünn- und Dickdarm; nur geringe Veränderungen wies die Leber auf.

3) In der Gruppe I wurde die Hemmwirkung des Pepstatins gemessen. Eine Verminderung der Aktivität, bezogen auf Gramm Frischgewicht, fand sich nur beim Magen. Eine deutliche Erhöhung der Aktivität im Vergleich zur Gruppe O wurde dagegen bei Milz, Dünn- und Dickdarm gemessen.

4) Auch bezogen auf mg Protein war ein Abfall der Aktivität nur bei Milz und Magen zu sehen. Zu einer Erhöhung der spezifischen Aktivität kam es dagegen bei Leber, Niere, Lunge, Dünn- und Dickdarm.

5) Beim Tod der Tiere der Gruppe I, also nach Absetzen der Pepstatin-Therapie, fand sich mit Ausnahme des Magens bei allen Organen ein Abfall der neutralen Proteinaseaktivität, noch unter den Wert der Kontrolltiere.

6) Dieser Abfall in der Gruppe II beim Tod dieser Tiere ließ sich auch, bezogen auf mg Protein, bei Haut, Leber, Niere, Lunge, Dünn- und Dickdarm nachweisen.

Lediglich bei Milz und Magen fand sich ein geringer Wiederanstieg.

Lebenszeiten:

Es wurden die Lebenszeiten der Tiere der Gruppen O und II bestimmt und miteinander verglichen.

Alle Tiere der Gruppe O (ohne Pepstatin) starben vor den parallel dazu gehalten Tieren der Gruppe II (mit Pepstatin). Die Verlängerung der Lebenszeiten durch die Pepstatin-Therapie war signifikant.

6. Literaturverzeichnis

1. Anson, M.L.: The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin.
J. Gen. Physiol. 22, 79 (1939)
2. Anson, M.L.: The purification of cathepsin.
J. Gen. Physiol. 23, 695 (1940)
3. Aoyagi, T., T. Takeuchi, A. Matsuzakai, K. Kamamura, S. Kondo, M. Hamada, K. Maeda, H. Umezawa:
Leupeptins, new protease inhibitors from Actinomycetes.
J. Antibiotics, Tokyo, 22, 283 (1969)
4. Arturson, G.: Pathophysiological aspects of the burn syndrome with special reference to liver injury and alteration of capillary permeability.
Acta Chir. Scand. Supp. 274, 1 (1961)
5. Arturson, G. Injuri 1, 226 (1970)
6. Arturson, G.: Der Verbrennungsschock.
Triangel 13, 105 (1975)
7. Atsushi, S., A. Okitani, M. Fujimaki.
Agr. Biol. Chem. Tokyo 33, 579 (1969)
8. Baggiolini, M., H. Bretz, R. Dewald:
Subcellular localization of granulocyte enzymes.
in: Neutral proteases of human polymorphonuclear leukocytes.
ed.: Havemann, K., A. Janoff
Urban & Schwarzenberg Verlag (1978)
9. Barrett, A.J. Biochem. J. 104, 601 (1967)
10. Barrett, A.J.: Cathepsin D, purification of isoenzymes from human and chicken liver.
Biochem. J. 117, 601 (1970)

11. Barrett, A.J. (ed) Proteinases in mammalian cells and tissues.
Elsevier, North-Holland Biomedical Press (1977)
12. Baumeister, R.G., H. Rohmert, G.A. Weber
Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. 13, 185 (1979)
13. Bergentz, S.-E.: Der septische Schock
Triangel 13, 129 (1975)
14. Beatty, K., J. Bieth, J. Travis: Kinetics of association of serine proteinases
with native and oxidized α_1 -proteinase inhibitor and α_1 -chymotrypsin.
J. Biol. Chem. 255, 3931 (1980)
15. Bergmann, M., J.S. Fruton, H. Pollok:
The specificity of trypsin
J. Biol. Chem. 127, 643 (1939)
16. Blackwood, C., J. Mandl: An improved test for the quantitative determination
of trypsin, trypsin-like enzymes and enzyme-inhibitors.
Annal. Biochem. 2, 370 (1961)
17. Bradley, S.G.: Direct action of bacterial endotoxin on cells, mitochondria
and lysosomes.
in: Pathophysiological effects of endotoxin at the cellular level.
ed.: Mayde, J., R. Person
New York 1981
18. Buddecke, E.: Grundriß der Biochemie
De Gruyter Verlag, Berlin 1973
19. Bull, J.D., D.M. Jackson: The treatment of burns.
Brit. Med. J. 1, 1010 (1952)
20. Clowes, G.H., G.H. Farrington, W. Zuscneid:
Circulatory factors on the etiology of pulmonary insufficiency and
right heart failure accompanying severe spesis (peritonitis).
Ann. Surg. 171, 663 (1970)

21. Cope, O., F.D. Moore: Study of capillary permeability in experimental burns.
J. Clin. Invest. 23, 241 (1944)
22. Dietl, T., W. Dobrinski, K. Hochstrasser:
Human inter- α -trypsin inhibitor.
Hoppe-Seviers Z. Phys. Chem. 360, 1313 (1979)
23. Duswald, K.H., M. Jochum, H. Fritz: Neue Erkenntnisse zur Pathophysiologie und Pathobiochemie der Sepsis und des septischen Schocks.
Intense Care 2/82, 1 (1982)
24. Eisen, A.Z., J.J. Jeffrev, J. Gross: Human skin collagenase: isolation and mechanism of attack on the collagen molecule.
Biochem. Biophys. Acta 151, 637 (1968)
25. Eisen, A.Z.: Human skin collagenase: Lokalization and distribution in normal human skin.
J. Invest. Dermatol. 52, 442 (1969)
26. Erlanger, B.F., S.M. Vratisanos, N. Wassermann, A.G. Cooper.
J. Biol. Chem. 240, 3447 (1965)
27. Farrington, G.H., C.A. Savaris, G.R. Cosette, G.H.A. Clowes jr.:
Bloodborne factors in experimental peritonitis.
Surgery 68, 136 (1970)
28. Freudenberger, N., K.H. Riese, M.A. Freudenberger: The vascular endothelial system. Reaction to shock.
Methods of investigation.
Fischer Verlag Stuttgart 1983
29. Fritz, H.: Proteinase inhibitors in severe inflammatory process (septic shock and experimental endotoxemia):
Biochemical, pathophysiological und therapeutic aspects.
in: Protein degradation in health and disease.
Ciba Foundation Symp. 75, 351 (1980)

30. Fruton, J.S., G.W. Irving, M. Bergmann:
Classification of the cathepsins.
J. Biol. Chem. 141, 763 (1941)
31. Gauer, O.H., K. Kramer, R. Jung (ed):
Physiologie des Menschen, Bd. 3: Herz und Kreislauf.
Urban & Schwarzenberg Verlag 1972
32. Grillo, H.C., J. Gross: Collagenolytic activity during mammalian wound repair.
Develop. Biol. 15, 300 (1967)
33. Gross, F.: Inhibition of the renin-angiotensinogen reaction by pepstatin.
Science 175, (1978)
34. Grünert, A.: Der kolloidosmotische Druck.
Ulm 1981
35. Haferkamp, O.: Die akute Entzündung und ihre Zellen.
Dt. Ärzteblatt 14/80, 895 (1980)
36. Haferkamp, O.: Die akute Entzündung und ihre Mediatoren.
Dt. Ärzteblatt 15/80, 957 (1980)
37. Hartley, B.S.: Ann. Rev. Biochem. 29, 45 (1960)
38. Hedin, S.G.: Investigations on the proteolytic enzymes of the spleen of the ox.
J. Physiol. London, 30, 155 (1903)
39. Heine, A., R. Trenkel, R. Arbogast, T. Eisenbach:
Funktionelle Morphologie und Transitstrecke:
Probleme beim Schock.
Med. Welt 31, 558 (1980)

40. Heine, H.: Morphologische Grundlagen früher Schockphasen.
in: Proteinasen und ihre Inhibitoren.
ed.: Schnells, G.
peri-med Verlag 1983
41. Hess, M.L., A. Hastillo, L.J. Greenfield:
Spectrum of cardiovascular function during gramnegative sepsis.
Prog. Cardiovasc. Dis. 23, 279 (1981)
42. Ikezawa, H., T. Aoyagi, T. Takeuchi, H. Umezawa:
Effect of protease inhibitors of acinomyces on lysosomal peptid-
hydrolases from swine liver.
J. Antibiotics Tokyo 24, 488 (1971)
43. Jochum, M., J. Witte, H. Schiessler, H.K. Selbmann, G. Ruckdeschel,
H. Fritz: Clotting and other plasma factors in experimental endotoxemia:
inhibition of degradation bei exogenous proteinase inhibitors.
Eur. Surg. Res. 13, 151 (1981)
44. Jochum, M., H. Fritz, K.H. Duswald, E. Hiller: Plasma levels of human
granulocytic elastase- α_1 -proteinase inhibitor complex ($E\alpha_1$ -PI) in patients
with septicemia and acute leukemia.
in: Selected topics in clinical enzymology.
ed.: Goldberg, D., M. Werner
De Gruyter Verlag Berlin 1983
45. Jochum, M., K.H. Duswald, J. Witte, H. Fritz:
Elastase- α_1 -Proteinaseinhibitor-Komplex ($E\alpha_1$ -PI):
ein Indikator für pathobiochemische Veränderungen bei entzündlichen
Prozessen.
in: Proteinasen und ihre Inhibitoren.
ed.: Schnells, G.
peri-med Verlag Erlangen 1983
46. Kamamura, K., S. Kondo, K. Maeda, H. Umezawa:
Structures and synthesis of leupeptins Pr-LL and Ac-LL.
Chem. Pharm. Bull. 17, 1902 (1969)

47. Kay, J., E.G. Afting, T. Aoyagi, B.M. Dunn:
The effects of lactoyl-pepstatin and the pepsin inhibitor peptide on
pig Cathepsin D.
Biochem. J. 203, 795 (1982)
48. Keilová, H., B. Keil: Isolation and specificity of cathepsin B.
FEBS Letter 4, 295 (1969)
49. Keilová, H.: On the specificity and inhibition of cathepsin D and B.
in: Tissue proteinases.
ed.: Barrett, A.J., J.T. Dingle
North-Holland Publishing Company 1971
50. Keilová, H.: Bovine cathepsin B and D.
in: Tissue proteinases.
ed.: Barrett, A.J., J.T. Dingle
North-Holland Publishing Company 1971
51. Klebanoff, S.J., R.A. Clark: The neutrophil. Function and clinical disorder.
North-Holland Publishing Company, Amsterdam 1978
52. Komonami, E., S. Hashida, N. Katunuma:
Biochem. Biophys. Res. Commun. 93, 713 (1980)
53. Koslowski, L.: Verbrennungen und ihre Behandlung.
Med. Welt 20, 1263 (1972)
54. Kunimoto, S., T. Aoyagi, H. Morishima, T. Takeuchi, H. Umezawa:
Mechanism of inhibition of pepsin by pepstatin.
J. Antibiotics Tokyo 25, 251 (1972)
55. Kunimoto, S., T. Aoyagi, R. Nishizawa, T. Komai, T. Takeuchi, H. Umezawa:
Mechanism of inhibition of pepsin by pepstatin. II.
J. Antibiotics Tokyo 27, 413 (1974)
56. Lapresle, C., T. Webb: Study of a proteolytic enzyme from rabbit spleen.
Biochem. J. 76, 538 (1960)

57. Lapresle, C., T. Webb: The purification and properties of a proteolytic enzyme, rabbit cathepsin E, and further studies on rabbit cathepsin D.
Biochem. J. 84, 455 (1962)
58. Lasch, H.G.: Klinik und Pathophysiologie des Schocks.
Verh. Dtsch. Ges. Path. 62, 2 (1978)
59. Lasch, H.G.: Der septische Schock. Klinik und Therapie.
Med. Welt 30, 591 (1979)
60. Lazarus, G.S., P.S. Brown, J.R. Daniels, H.M. Fullmer:
Human granulocyte collagenase.
Science 159, 1483 (1968)
61. Lillehey, R.C., R.H. Dietzmann, G.S. Moutsav, L.S. Shultz, L.H. Romero,
C.B. Beckmann:
The pharmacological approach to the treatment of shock.
Geriatrics 8, (1972)
62. McDonald, J.K., S. Ellis, R.B. Zeitmann
Nature 225, 1048 (1970)
63. McDonald, J.K., P.X. Callahan, S. Ellis, R.E. Smith:
Polypeptide degradation by Dipeptylaminopeptidase I.
in: Tissue Proteinases
ed: Barrett, A.J., J.T. Dingle
North-Holland Publishing Company, Amsterdam (1971)
64. McGovern, V.J., D.J. Tiller: Shock: A clinicopathologic correlation.
Masson Publications New York 1980
65. McLean, L.D., W.G. Mulligan, A.P. McLean:
Patterns of septic shock in man.
Ann. Surg. 166, 543 (1967)

66. Meßmer, K.: Pathophysiologische Aspekte und Probleme des Schocks.
Triangel 13, 85 (1975)
67. Morishima, J., T. Takita, T. Aoyagi, T. Takeuchi, H. Umezawa: The
structure of pepstatin.
J. Antibiotics Tokyo 23, 263 (1970)
68. Müller, F.E.: Die Infektion der Brandwunde.
Hefte zur Unfallheilkunde 136
Springer Verlag 1979
69. Nagel, W., F. Willig: Verteilung von proteolytischen Enzymen in Organen
und Zellbestandteilen.
Naturwissensch. 51, 115 (1964)
70. Oettinger, W., K. Heil, G. Walter: Pulmonary metabolism of prostaglandin
 F_2 in human septic shock.
XVth Congress of the European Society of Surgical Research, Brussels,
Belgium (1980)
71. Ohlsson, K., I. Ohlsson: The neutral proteases of human granulocytes.
Eur. J. Biochem. 42, 519 (1974)
72. Ohlsson, K.: Proteases, an biological control.
Cold Spring Harbor Conferences on Cell Proliferation, p. 603 (1975)
73. Otto, K.: Über ein neues Kathepsin.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 350, 1577 (1967)
74. Otto, K.: Z. Physiol. Chem. 348, 1449 (1969)
75. Otto, K., S. Bhakdi: Zur Kenntnis des Kathepsin B: Spezifität und Eigenschaften.
Hoppe-Sevler's Z. Physiol. Chem. 350, 1581 (1967)

76. Otto, K.: Cathepsin B₁ and B₂.
in: Tissue Proteinases
ed.: Barrett, A.T., T.T. Dingle
North-Holland Publishing Company Amsterdam, 1971
77. Ouchterlony, Ö.: Acta Pathol. Microbiol. Scand. 25, 186 (1948)
78. Press, E.M., R.R. Porter, J. Gebr: The isolation properties of a proteolytic enzyme, cathepsin D, from bovine spleen.
Biochem. J. 74, 501 (1960)
79. Reynolds, D., N.J. Guril, T. Vargish: Blockade of opiate receptors with naloxine improves survival and cardiac performance in canine endotoxin shock.
Circ. Shock 7, 39 (1980)
80. Rossiter, R.J.: Carbohydrate metabolism after burning.
Quart. J. of Exp. Phys. Cognate Medical Sciences 32, 279 (1944)
81. Sawant, P.L., S. Shibko, U.S. Kumta, A.L. Tappel: Isolation of rat liver lysosomes and their general properties.
Biochem. Biophysic. Acta 85, 82 (1964)
82. Schnells, G.: Die geformten Blutbestandteile im septischen Schock als Beispiel des Membranverhaltens im Schock.
in: Proteinase und ihre Inhibitoren.
ed.: Schnells, G.
peri-med Verlag Erlangen 1983
83. Schuster, H.P.: Schock, Wandel der Perspektiven.
Internist 23, 463 (1982)
84. Sheagren, J.M.: Septic shock and corticosteroids.
N. Eng. J. Med. 305, 456 (1981)
85. Shoemaker, W.C.: Shock: Chemistry, Physiology and Therapie.
Springfield 1967

86. Siebert, G., A. Schmitt, G. Träxler: Reinigung und proteolytische Spezifität eines neuen Kathepsins aus Dorschmilz.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 342, 20 (1963)
87. Spelsberg, D.: Med. Inauguraldissertation Universität München 1975
88. Stossel, T.P.: The mechanism of phagocytosis.
J. Reticuloendothel. Soc. 19, 237 (1976)
89. Takio, K., T. Towatari, N. Katunama, K. Titani: Primary structure study of rat liver cathepsin B.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 97, 340 (1980)
90. Towatari, T., K. Tanaka, D. Yoshikawa, N. Katunama:
FEBS Letter 67, 284 (1976)
91. Towatari, T., K. Tanaka, D. Yoshikawa, N. Katunama: J. Biochem. Tokyo, 84, 659 (1978)
93. Umezawa, H., T. Aoyagi, H. Morishima, M. Matsuzaki, M. Hamada, T. Takeuchi: Pepstatin, a new pepsin inhibitor, produced by actinomycetes.
J. Antibiotics Tokyo, 22, 259 (1970)
94. Umezawa, H., T. Aoyagi, M. Morishima, S. Kunimoto, M. Matsuzaki, M. Hamada, T. Takeuchi: Chymostatin, a new Chymotrypsin inhibitor produced by actinomycetes.
J. Antibiotics Tokyo, 23, 425 (1970)
95. Umezawa, H., T. Miyano, M. Tomiyasu, J. Jizuka, S. Tomisaka, T. Takita, T. Aoyagi: New pepstatins, pepstatin B and C, and peptanone A, produced by actinomycetes.
J. Antibiotics Tokyo, 25, 489 (1972)
96. Waisbren, B.A.: Bacteriemia due to gramnegative bacilli other than salmonella.
Arch. Intern. Med. 88, 467 (1951)
97. Weber, G.A.: Med. Inauguraldissertation Universität München 1982

98. Weichselbaum, T.E.:
Amer. Clin. Path. Techn. Bull. 10, 40 (1946)
99. Weil, M.H., R. Henning, V. Puri, Colloid oncotic pressure: Clinical significance.
Crit. Care Med. 7, 113 (1979)
100. Willstätter, R., E. Bamann: Über die Proteasen der Magenschleimhaut. Erste Abhandlung über die Enzyme der Leukozyten.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 180, 127 (1929)
101. Winter, C.A., E.A. Rislev, G.W. Nuss: Carrageenin induced edema in kind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 111, 544 (1962)
102. Witte, J., H. Schiessler, R. Scherer, M. Jochum, W. Schramm, H. Fritz: Hyperdynamer septischer Schock des Menschen: Konzentrationsverlauf von ausgewählten Gerinnungsfaktoren und Plasmaproteinen.
Chir. Forum Exp. Klin. Forsch. 55, (1979)
103. Zellner, P.R., T. Moser: Aktuelle Therapie der Verbrennungskrankheit.
Gelbe Hefte 24, 153 (1984)

Lebenslauf

Geboren am : 23. April 1950
in : Wuppertal
Volksschule : September 1956 - 1960 in Augsburg
Gymnasium : September 1960 - 1969 Peutinger-Gymnasium
Augsburg
Reifeprüfung : 1969 Peutinger-Gymnasium Augsburg
Pharmazie-Praktikum : September 1969 - Juli 1971
Schwanen-Apotheke Augsburg-Göggingen
Pharmazeutische : Juni 1971
Vorprüfung
Apotheker-Assistent : September 1971 - Mai 1972
Frauentor-Apotheke Augsburg
Medizinstudium : Sommersemester 1972 - Wintersemester 1979
Ludwig-Maximilian-Universität München
Ärztliche Prüfung : 4. Mai 1979
Approbation : 11. Mai 1979
Wehrdienst : 1. Juli 1979 - 30. September 1980
Stabsarzt Panzerbataillon 283 Münsingen
Assistenzarzt : seit 1. September 1980
Zentrale Anästhesieabteilung des Landkreises
Ostallgäu und des KHZV Kaufbeuren-Ostallgäu
Facharztprüfung : 8. Mai 1985
Anerkennung als Arzt für Anästhesie

Danksagung

Herrn Prof. Dr. G. Heberer danke ich für die Überlassung des Themas.

Herrn Prof. Dr. R. Baumeister und Herrn Prof. Dr. H. Fritz gilt mein Dank für die stete und uneingeschränkte Hilfe während dieser Arbeit.

Frau Dr. Mursić danke ich für die Herstellung der E. coli-Suspension.

